

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 37/02, 31/45, 39/395 A61K 37/46, 35/12, 31/645 C12Q 1/02, C12N 5/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 92/17193 (43) Date de publication internationale: 15 octobre 1992 (15.10.92)
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR92/00265

(22) Date de dépôt international: 23 mars 1992 (23.03.92)

(30) Données relatives à la priorité:
91/03739 27 mars 1991 (27.03.91) FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28, rue du Docteur-Roux, F-75724 Paris Cédex 15 (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur-Calmette, F-59019 Lille Cédex (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : AMEISEN, Jean-Claude [FR/FR]; 58, avenue Kennedy, F-59800 Lille (FR). GROUX, Hervé [FR/FR]; 50, boulevard Victor-Hugo, F-59000 Lille (FR). CAPRON, André [FR/FR]; 58, rue du Capitaine-Jasmin, F-59133 Phalempin (FR). AMEISEN, Fabienne [FR/FR]; 58, avenue Kennedy, F-59800 Lille (FR).

(74) Mandataire: PHELIP, Bruno; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de la Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), GR (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), MC (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.

Publiée

*Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si de telles modifications sont
reçues.*

(54) Title: MEDICAMENT CONTAINING AN AGENT INHIBITING IN VIVO PATHOLOGICAL APOPTOSIS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre: MEDICAMENT CONTENANT UN AGENT INHIBANT IN VIVO L'APOPTOSE PATHOLOGIQUE ET APPLICATIONS

(57) Abstract

A medicament containing an agent inhibiting in vivo pathological apoptosis may contain: an agent capable of blocking the reception or transduction of signals leading to cell suicide, or an agent providing or generating a co-signal enabling normal cell differentiation and multiplication, or an agent which, alone, causes cell proliferation and differentiation, and generates cells which have lost the suicide capability in pathological conditions, or an agent capable of inhibiting the signals which make a cell capable of responding to activation, by pathological apoptosis. Said medicaments may be used in treating retrovirus related diseases, and in particular diseases related to the lentiviruses such as the HIV in humans.

(57) Abrégé

Ce médicament peut contenir: soit un agent capable de bloquer la réception ou la transduction de signaux conduisant au suicide des cellules, soit un agent apportant ou générant un cosignal permettant à la cellule de se différencier et de se multiplier normalement, soit un agent qui à lui seul entraîne la prolifération et la différenciation cellulaires et génère des cellules qui ont perdu la capacité à se suicider dans des conditions pathologiques, soit un agent capable d'inhiber les signaux qui rendent une cellule susceptible de répondre à une activation, par une apoptose pathologique. De tels médicaments peuvent être utilisés dans le traitement des maladies liées au rétrovirus, et en particulier liées aux lentivirus tels que le virus HIV chez l'homme.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MG	Madagascar
AU	Australie	FI	Finlande	ML	Mali
BB	Barbade	FR	France	MN	Mongolie
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	GR	Grèce	NO	Norvège
BR	Brésil	HU	Hongrie	PL	Pologne
CA	Canada	IT	Italie	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CG	Congo	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CH	Suisse	KR	République de Corée	SE	Suède
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark			US	Etats-Unis d'Amérique

"Médicament contenant un agent inhibant in vivo
l'apoptose pathologique et applications".

5 La présente invention concerne le traitement de l'apoptose de cellules humaines caractérisée par le dysfonctionnement ou la déficience de certaines populations cellulaires .

Elle a également pour objet une méthode de sélection d'agents de traitement de l'apoptose dans ses manifestations pathologiques .

10 Elle est d'autre part relative à des méthodes de détermination de la capacité de cellules d'individus atteints par un virus HIV à répondre à l'agression par un agent infectieux .

15 Le terme apoptose est synonyme des expressions "mort cellulaire programmée" ou " mort induite par l'activation".

Dans la présente description il sera essentiellement question d'apoptose .

20 L'apoptose est un mécanisme de suicide des cellules qui a pour particularité d'être physiologiquement actif . Il est impliqué dans la régénération des tissus ainsi que dans l'involution durant l'embryogénèse et la vie adulte et la maturation du système immunitaire embryonnaire .

25 De ce fait , l'apoptose se différencie de la nécrose qui est une réponse à des agressions de la cellule .

30 On sait également que l'apoptose est toujours liée à la réception ou à la non réception par la cellule d'un signal physiologique donné .

L'apoptose a des conséquences pathologiques d'autant plus grandes qu'elle peut survenir dans des populations cellulaires que l'organisme n'est pas capable de régénérer sous leur forme adulte

différenciée , notamment les cellules lymphocytaires à mémoire et les neurones .

En cas d'apoptose , la capacité de régénération cellulaire de l'organisme peut être aussi dépassée d'un point de vue quantitatif..

Dans la présente description le mot "pathologique" concerne également des phénomènes tels que la dégénérescence cellulaire ou le vieillissement impliquant une involution .

L'apoptose ne concerne que les cellules en cours de disparition, et n'entraîne pas d'effets sur l'environnement tissulaire et cellulaire : elle n'est donc pas un phénomène apparent , sauf si l'on cherche réellement à la mettre en évidence .

On a déjà montré que , dans le cas des thymocytes non matures , la mobilisation du récepteur des cellules T (TCR) conduit à l'apoptose . Ce phénomène joue un rôle essentiel dans la sélection du répertoire des cellules T. (Blackman et al., Science , 248 ; 1335-1341 ; 1990) .

On sait par ailleurs que certains rétrovirus sont responsables du dysfonctionnement et de l'effondrement du système immunitaire ainsi que du dysfonctionnement et l'involution de certains tissus .

Il s'agit notamment de lentivirus provoquant des désordres pathologiques se traduisant par une apparition anormale de suicides cellulaires .

A titre d'exemple de tels lentivirus , on peut citer les virus SIV chez le singe , FIV chez les félins , BIV chez les bovins , VISNA chez les ovins , CAEV chez les caprins et HIV chez l'homme .

Il a aussi été montré que les individus infectés par un virus HIV présentent de manière précoce des lacunes dans la réponse d'une famille de

lymphocytes T : les lymphocytes T CD4 helper (TH) .
Ces lacunes d'ordre qualitatif précèdent des
réductions quantitatives de cette population
cellulaire et sont caractérisées par une perte
5 sélective de la prolifération en réponse à des
antigènes du complexe majeur d'histo-compatibilité de
classe II (MHC-II) et à un mitogène extrait de
Phytolacca americana, dénommé mitogène pockeweed ou
PWM dans la suite du texte , voir notamment Lane et
10 al.(N. Engl. J. Med. 313, 79-84, 1985) et Van Noesel
et al.(J. Clin. Invest, 86, 293-299, 1990).

Ces derniers auteurs ont en outre montré que
l'anticorps anti-CD28 augmente la prolifération de
cellules T chez des patients infectés par le virus
15 HIV₁, et permet ainsi une réponse proliférative de
thymocytes immatures à l'anti-CD3, et à deux anticorps
anti-CD2.

De plus , il a été montré récemment que les
cellules T adultes humaines et murines normales
20 peuvent aussi subir l'apoptose dans des conditions
particulières (Newell, et al. Nature 347 , 286-289
(1990); Janssen O. et al. J. Immunol., 146, 35-39 ,
1991) . Dans ce cas , l'apoptose induite par
stimulation diffère de celle observée dans les
25 thymocytes immatures .

Dans des cellules T humaines adultes portant
le récepteur TCR gamma-delta et stimulées par
l'anticorps anti-CD3, l'addition d'Interleukine-2
induit l'apoptose au lieu de la prévenir (Janssen et
30 al. J. Immunol., 146, 35-39 , (1991).

Les résultats faisant partie de l'état de la
technique ne concernent que des cultures cellulaires
in vitro et ne mentionnent aucune application
thérapeutique.

De plus , les publications connues des
Demandeurs ne mentionnent pas l'existence et encore
moins le rôle du phénomène d'apoptose dans la perte de
la prolifération des cellules T issues de patients
5 infectés par un virus HIV , et ne donnent aucune
explication quant à la perte sélective de réponse de
patients infectés par les virus HIV vis-à-vis de
certaines maladies ou vis-à-vis de certains antigènes.

Les demandeurs se sont donc attachés à trouver
10 un agent thérapeutique efficace notamment vis-à-vis
des maladies liées au virus HIV .

Dans le cadre de leurs travaux , ils ont
également apporté une explication au phénomène de
perte de réponse à l'égard de certains antigènes ou de
15 certaines maladies rencontrées en particulier dans le
cas d'infections par les virus HIV , en vue
d'applications thérapeutiques et préventives vis-à-vis
de ces maladies . Ils ont ainsi montré que de manière
surprenante le mécanisme responsable de cette perte de
20 réponse , est du type apoptose .

Ils ont aussi montré de manière tout aussi
surprenante que les mécanismes impliqués dans
l'apoptose pathologique des cellules issues de
patients atteints par un virus HIV se différencient
25 des mécanismes de l'apoptose non liée aux virus HIV ,
telle que l'apoptose induite par une stimulation du
récepteur T de thymocytes humains normaux ou de
lignées lymphocytaires T matures humaines normales.

Selon l'invention , il a été trouvé que l'on
30 pouvait inhiber in vivo l'apoptose pathologique .

La présente invention a donc pour objet un
médicament contenant un agent inhibant in vivo
l'apoptose pathologique .

Un tel agent peut être sélectionné par un procédé comprenant au moins les étapes :

- mise en contact d'au moins deux préparations cellulaires d'un patient infecté par un rétrovirus avec un agent d'activation cellulaire , tel que du mitogène pokeweed (PWM), respectivement en présence et en absence dudit agent , et

- comparaison de la prolifération et/ou de la mortalité dans les deux préparations cellulaires .

Il peut aussi être sélectionné par un procédé comprenant au moins :

- une première présentation d'un antigène par des monocytes préincubés avec un rétrovirus, à une lignée cellulaire de lymphocytes T CD4⁺,

- une seconde présentation de l'antigène par des monocytes , éventuellement préincubés avec un rétrovirus , à la lignée cellulaire de lymphocytes T CD4⁺,et

- une étape d'estimation de la mort et/ou de la prolifération des lymphocytes .

Préférentiellement , le rétrovirus est un HIV.

Une telle méthode permet de sélectionner un agent qui empêche directement l'induction de l'apoptose.

Le virus en présence d'un agent selon l'invention ne peut enseigner aux cellules l'apoptose.Cette méthode contrairement à la précédente concerne directement le virus.

Un agent selon l'invention sera choisi parmi ceux capables:

- soit de bloquer la réception ou la transduction de signaux conduisant au suicide des cellules , et en particulier capables d'inhiber l'activation d'une endonucléase nucléaire entraînant

la fragmentation du génome de la cellule , tel que la cyclosporine , ou un inhibiteur de la synthèse protéique tel que la cycloheximide ;

5 - soit d'apporter ou de générer un co-signal permettant à la cellule de se différencier et de se multiplier normalement tel qu'un anticorps anti-CD28 ou une association d'un agent entraînant la stimulation de la phosphokinase C tel qu'un ester du phorbol , avec l'interleukine 1 ;

10 - soit d'entraîner à eux seuls la prolifération et la différenciation cellulaires et de générer des cellules qui ont perdu la capacité à se suicider dans des conditions pathologiques , par exemple , la phytohémagglutinine (PHA) , des cellules allogéniques irradiées , un anticorps anti-CD2, ou un
15 anticorps anti-CD3.

- soit d'inhiber les signaux qui rendent une cellule susceptible de répondre à une activation par une apoptose pathologique .

20 Les cellules allogéniques irradiées sont des cellules provenant d'un individu génétiquement différent quant à son système HLA.

Un tel médicament est notamment destiné au traitement des maladies liées au rétrovirus et en particulier liées au lentivirus , tels que les virus
25 HIV chez l'homme et SIV , FIV , BIV , VISNA et CAEV chez l'animal .

La présente invention a d'autre part pour objet l'utilisation d'un agent tel que précédemment défini pour l'obtention d'un médicament destiné au
30 traitement des maladies précédemment citées .

Elle concerne d'autre part une composition pharmaceutique contenant une quantité pharmaceutiquement efficace d'un agent tel que défini

précédemment en association avec un ou plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement acceptables . Une telle composition est destinée au traitement de maladies liées au rétrovirus et en particulier liées au lentivirus .

Le traitement des patients atteints par ces maladies se fera d'une manière connue en soi et préférentiellement par voie parentérale ou intraveineuse .

La présente invention concerne d'autre part une méthode de détermination de la déficience qualitative du répertoire immunologique d'individus vis-à-vis d'un agent infectieux comprenant au moins les étapes de :

- stimulation in vitro des lymphocytes dans un milieu contenant au moins un anticorps anti-CD28 en présence d'un ou plusieurs antigènes spécifiques de l'agent infectieux, et

- mesure de la cinétique de prolifération des lymphocytes .

L'objet de la présente invention est d'autre part une méthode de détermination de la capacité des lymphocytes d'un individu à répondre à l'agression par un agent infectieux comprenant au moins les étapes de:

- stimulation in vitro des lymphocytes dans un milieu contenant au moins un anticorps anti-CD28 en présence d'un ou plusieurs antigènes spécifiques de l'agent infectieux, et

- mesure de la cinétique de prolifération des lymphocytes .

La présente invention est de plus relative à une méthode de stimulation in vitro de lymphocytes issus de patients atteints d'une maladie liée aux

rétrovirus par traitement des lymphocytes isolés par un anticorps anti CD28.

Enfin, la présente invention concerne une méthode de sélection d'un agent inhibant in vivo l'apoptose pathologique comprenant au moins une étape de mise en contact de cellules infectées par un lentivirus tel qu'un virus HIV , avec un antigène , respectivement en présence et en absence dudit agent et consécutivement de stimulation par ledit antigène .

Une différence de réponse entre les cellules cultivées en présence et en absence dudit agent constituerait un indice de l'activité inhibitrice de cet agent .

L'anticorps anti-CD28 préférentiellement utilisé pour la mise en oeuvre de la présente invention est l'anticorps monoclonal de souris issu du clone CLB-402 (n° de catalogue JANSSEN 1989 26.683.08) commercialisé par la Société JANSSEN .

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples d'application suivants, dans lesquels :

La figure 1a est un diagramme illustrant la prolifération de cellules de patients infectés par le virus HIV₁ et d'individus sains en présence de phytohemagglutinine (PHA) , de PWM, de super-antigènes d'entérotoxine B de staphylocoque (SEB) ou de toxine tétanique (TT).

La figure 1b est un diagramme montrant l'effet de l'anticorps anti-CD28 sur la prolifération de cellules de patients infectés par le virus HIV₁ , en présence de PWM , de SEB ou de TT .

La figure 2a illustre la mortalité de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de patients infectés par le virus HIV₁ (colonnes 1) et

d'individus sains (colonnes 2) , en présence de cycloheximide , de cyclosporine A (CSA) , d'anticorps anti-CD28, de PWM , ou de SEB .

5 La figure 2b illustre la mortalité cellulaire de cellules PBMC de patients atteints par le virus HIV₁ (colonnes 1) et d'individus sains (colonnes 2) desquelles on a éliminé les cellules T CD4+ ou les cellules T CD8+ , en présence ou en absence d'anticorps anti-CD28 , de PWM ou de SEB.

10 La figure 3 illustre les résultats obtenus après incorporation de thymidine tritiée dans des cellules de patients atteints par un virus HIV en présence de PWM , ou de PHA.

15 La figure 4 est un autoradiogramme représentant l'hybridation de RNA total de cellules PBMC de patients atteints par le virus HIV , cultivées en présence de PWM ou de PHA , avec une sonde d'ADN complémentaire du récepteur de l'interleukine-2.

20 La figure 5 est un cliché d'un gel d'électrophorèse de DNA de cellules PBMC de patients infectés par le virus HIV₁, cultivées en présence de PWM ou de SEB et d'individus sains .

25 Les figures 6a et 6b représentent respectivement des photographies en microscopie électronique de cellules PBMC d'individus sains et de patients atteints par le virus HIV₁ .

30 Les figures 7a et 7b sont des histogrammes correspondant respectivement à la prolifération et à la mort cellulaire de cellules cultivées dans un milieu simple (colonne 1) , dans un milieu complémenté avec de l'IL-2 (10 unités/ml - colonne 2) et activées avec de l'anticorps CD5 lié comme témoin (colonne 3) ou par de l'anticorps CD3 lié (colonne 4 à 8) en présence d'IL-1 recombinante (50 unités/ml)

colonne 5 , d'IL-2 recombinante (10 unités/ml colonne 6) , d'anticorps anti-IFNgamma (dilution sérique 1/800 - colonne 7) ou de cycloheximide (50 μ /ml - colonne 8) .

5 La figure 7c est un gel d'électrophorèse d'ADN extrait de thymocytes médullaires cultivés dans un milieu simple (colonne 1) ou stimulés par du CD3 (colonnes 4, 5 et 7) en présence d'Interleukine recombinante (colonne 5) ou d'anticorps anti-IFNgamma (colonne 7) .

10 La figure 7d représente une analyse par dot blot d'ARN de thymocytes médullaires stimulés par du milieu simple (colonne 1) par de l'IL-1 recombinante (colonne 2) par du CD3 lié (colonne 3) ou par du CD3 et de l'IL-1 recombinante (colonne 4) .

15 La figure 8 représente un gel d'électrophorèse d'ADN de cellules T de chimpanzés infectés par le virus HIV (colonnes 1 à 4) ou de chimpanzés témoins (colonnes 5 et 6) après stimulation in vitro avec le super antigène SEB .

20 La figure 9 représente un gel d'électrophorèse en agarose d'ADN de cellules T de macaques témoins stimulées avec le SEB (colonnes 1 et 2) de cellules T de macaques infectées avec le virus SIV incubées dans un milieu simple (colonnes 3, 5 et 7) et de 25 cellules T de macaques infectées avec le virus SIV , incubées avec le SEB (colonnes 4, 6 et 8) .

La figure 10 représente un gel d'électrophorèse d'ADN de cellules T de macaques infectées par le virus SIV incubées dans du milieu simple (colonnes 1 et 3) ou du milieu + SEB colonnes 2 et 4) , de cellules T de singes verts infectées par le SIV et incubées avec du SEB(colonnes 30

5 à 7) et de cellules T de singes verts incubées avec du SEB (colonnes 8 et 9).

EXEMPLE 1 :

5 Prolifération in vivo des lymphocytes T de patients asymptomatiques infectés par le virus HIV₁.

a) Stimulation par des activateurs polyclonaux.

10 La prolifération des lymphocytes T de 38 patients infectés par le virus HIV-1 et de 20 individus sains a été testée en réponse aux activateurs polyclonaux phytohé- hémagglutinine , concanavaline A , mitogène pokeweed (PWM) , anticorps monoclonal anti-CD3 , et en réponse à la stimulation par l'antigène de la toxine tétanique TT .

15 Les cellules T mémoires spécifiques de l'antigène TT étant rares , et pouvant avoir été éliminées chez des patients infectés par le virus HIV , la réponse à la mobilisation des récepteurs de cellules T par l'utilisation des superantigènes de 20 l'entérotoxine B du staphylocoque (SEB) a aussi été testée.

25 Les SEB se lient aux molécules MHC-II et agissent avec des molécules V β des récepteurs de cellules T (TCR) exprimés par jusqu'à 30% des cellules T normales , et induisent la prolifération des cellules T normales matures (Marrack et Kappler , J. Science 248 , 705-711 , 1990) et l'apoptose chez les thymocytes immatures (Genkinson et al. J. Immun. 19, 2175-20177 , 1989).

30 Pour évaluer l'intensité de la réponse , on a effectué les mesures après l'incorporation de la thymidine tritiée dans les cellules . (figure la). Les patients infectés par le HIV comprenaient 26 hommes et 12 femmes , 25 patients étant au stade de

CDC II A (pas d'anormalité biologique, cellules CD4 $> 500 /\text{mm}^3$, et en moyenne de $856 /\text{mm}^3$) et 13 d'entre eux étaient au stade CDC IIB (anormalité biologique, cellules CD4 $< 500/\text{mm}^3$ et en moyenne de $345/\text{mm}^3$).

5 L'infection par le HIV était attribuée pour 15 des patients à des relations homosexuelles, pour 14 des patients à des relations hétérosexuelles, pour 7 des patients à l'utilisation d'une drogue intraveineuse et pour 2 des patients à la transfusion sanguine.

10 Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été obtenues sur Ficoll-Hypaque et ont été cultivées comme décrit par Reed et al. (Proc. National Acad. Sci. USA 83, 3982-3986 (1986)). Les PBMC sont incubées à une densité
15 cellulaire de $2,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ durant 3 jours avec du milieu de culture sans adjuvant, du milieu contenant de la phytohémagglutinine (PHA) à $10\mu\text{g}/\text{ml}$, du mitogène pokeweed (PWM) à $10\mu/\text{ml}$, du superantigène
20 d'entérotoxine B de staphylocoque (SEB) à $1\mu\text{g}/\text{ml}$, ou durant 6 jours avec l'antigène (TT) à $10\mu\text{g}/\text{ml}$.

La prolifération des cellules T des patients HIV+ à la Concanavaline A ($10\mu\text{g}/\text{ml}$), à l'anticorps monoclonal CD3 (Groux et al. Nature, 339, 152-154, 25 1989) est seulement légèrement réduite (résultat non indiqué sur la figure) de même que la prolifération en présence de PHA.

30 Sur la figure la chaque cercle représente la moyenne de cultures effectuées en triplica, les barres horizontales représentant la moyenne des résultats pour chaque traitement.

Ces résultats montrent que, tandis que des cellules T des individus témoins prolifèrent en réponse à tous les stimuli, des cellules T des

patients infectés par le virus HIV répondent de manière moindre à la stimulation par le PWM , le SEB ou l'antigène TT (figure la).

5 b) Stimulation en présence d'un anticorps anti-CD28.

On a également fait des essais en incorporant de la thymidine tritiée dans des cellules T de 19 des patients infectés par le HIV (figure 1 b) en réponse à la prolifération par les PWM, SEB ou TT , en
10 l'absence ou en présence d'anticorps anti- CD28.

Dans cet exemple ainsi que dans ceux qui suivent l'anticorps anti-CD-28 est fourni par la Société JANSSEN (anticorps monoclonal de souris issu du clone CLB-402) .

15 Des cellules ont été préparées et utilisées comme décrit pour la figure la et l'anticorps anti-CD28 a été ajouté à une concentration de 10µg/ml .

La figure 1_b montre que l'anticorps anti-CD28 augmente la prolifération des cellules T témoins en
20 présence de PWM ou de SEB .

Par contre les anticorps CD5 (A50,gamma 1, CD43 (B1B6,gamma 1) ,CD44 (P245,gamma 2a) , et CD45R (ALB11, gamma 1, Immunotech) à des concentrations de 10 µg/ml ne stimulent pas la prolifération des
25 cellules T des patients HIV+ (résultats non indiqués sur la figure).

EXEMPLE 2:

Mortalité des cellules T et des cellules mononucléaires du sang périphérique de patients infectés par le virus HIV après culture in vitro en
30 présence de PWM et de SEB.

1) La figure 2 a) illustre la mort cellulaire de PBMC de patients infectés par le virus HIV ainsi

que de témoins , après culture in vitro en présence de PWM et de SEB.

Les résultats mentionnés sur la figure 2a) représentent la moyenne plus ou moins l'écart type d'expérimentations effectuées sur 20 patients différents infectés par le virus HIV (colonnes 1) et de 20 individus non infectés (colonne 2). La mortalité cellulaire est mise en évidence par la perméabilité au bleu trypan . Les PBMC sont cultivées avec une densité cellulaire initiale de $2,5 \cdot 10^5/\text{ml}$ en 48 heures dans du milieu de culture sans adjuvant , du milieu contenant du PWM (10 mg/ml) ou des SEB ($1 \mu\text{g/ml}$) en l'absence ou en présence de cycloheximide ($50 \mu\text{g/ml}$) de cyclosporine A (CsA) à 200 ng/ml ou d'anticorps monoclonal anti-CD28 ($10 \mu\text{g/ml}$) .

L'addition de PWM ou de SEB aux cellules PBMC de patients atteints par le virus HIV (colonnes 1) est suivie après 48 heures de culture par respectivement jusqu'à 60 et 30% de morts cellulaires, tandis qu'aucune mortalité cellulaire n'est observée à 48 heures pour les PBMC non stimulées de patients infectés par le virus HIV (colonnes 2), ainsi que pour les PBMC témoins stimulées (colonnes 2) qui montrent jusqu'à 95% de viabilité (figure 2 a).

La culture des cellules en présence d'anticorps monoclonal CD3 n'entraîne pas de mortalité des cellules T (résultats non indiqués sur les figures).

Après 48 heures de culture en milieu sans adjuvant , la mortalité cellulaire de base des cellules PBMC de 40 patients infectés par le virus HIV ne dépasse jamais 10% (en moyenne 5,3 %).

2) La figure 2b concerne des expérimentations similaires . Les cellules PBMC d'un patient infecté

par le virus HIV (colonnes 1) et d'un individu non infecté (colonnes 2) ont été purifiées par élimination des cellules T CD4 + (cellules CD 8) ou des cellules T CD8 + (cellules CD 4) par incubation avec respectivement des anticorps IOT4 ou IOT8 suivie par incubation avec des particules magnétiques couvertes d'anticorps IgG de chèvre anti-souris .

La qualité de l'élimination est mesurée par cytofluorométrie (Epix Coulter Clone) et montre que la contamination cellulaire est inférieure à 1% . Les cellules sont cultivées comme décrit pour la figure la). Les résultats représentent la moyenne de trois mesures de la mortalité cellulaire après 48 heures . La prolifération est mesurée par incorporation de la thymidine tritiée après 3 jours .

Les cellules CD4 des individus non infectés prolifèrent en réponse au PWM (5250 + 651 CPM) et au SEB (21.642 + 2.317 CPM) , tandis que les cellules témoins CD8 et les cellules CD4 et CD8 des patients infectés par le virus HIV ne prolifèrent pas après 5 jours.

L'addition d'anticorps anti-CD28 aux cellules CD4 des patients infectés par le virus HIV restaure la capacité de ces cellules à proliférer lors de stimulation par le PWM et le SEB , mais n'a pas d'effet sur les cellules de patients infectés par le HIV non stimulées ou sur des cellules CD8 témoins .

3) La figure 3 illustre la prolifération des cellules PBMC de patients infectés par le virus HIV et d'individus sains après addition de PWM ou de PHA, après incorporation de thymidine tritiée dans les cellules T de 3 patients infectés par le virus HIV (ABC et B') et d'un individu sain (D) en réponse à

la stimulation par le PWM à 10µg/ml (colonnes A,B et C, et colonne D) ou par le PHA à 10µm/ml (colonne B').

Les colonnes B et B' représentent les résultats obtenus avec des PBMC du même patient infecté par le virus HIV. Tous les résultats sont la
5 moyenne (+/- l'écart type) de cultures effectuées en triplicate.

EXEMPLE 3 :

10 Synthèse des ARN messagers codant pour le récepteur à l'Interleukine-2.

La figure 4 illustre l'expression des RNA messagers codant pour le récepteur à l'interleukine 2 (IL-2R) de PBMC de patients infectés par le virus
15 HIV et d'individus sains après addition de PWM ou de PHA . Les mêmes patients (A, B, C, B' et D) que dans la figure 3 ont été repris . Cette expression est mesurée sur les mêmes cellules après 2 heures , 6 heures et 16 heures . Ces RNA messagers n'étaient pas
20 détectés avant la stimulation .

Les expérimentations ont été effectuées par extraction des ARN totaux cellulaires de 10⁷ PBMC par le RNazol (Cinna-Biotex, Friendwood, USA) selon les
25 instructions du fabricant. Les échantillons de RNA totaux (environ 10µg/ml) sont fractionnés en fonction de leur taille dans des gels d'agarose à 1% contenant du formaldéhyde et sont transférés sur des filtres HYBOND-N (Amersham). Les filtres sont ensuite hybridés avec des sondes de cDNA marquées au phosphate 32 (IL-
30 2R humain) et lavés avec une solution 0,1 SSC , 0,1 % SDS à 55°C. Les tailles relatives des mRNA IL-2R qui hybrident avec la sonde sont en accord avec les valeurs de 3,5 kb précédemment publiées .

EXEMPLE 4:

Dégradation de l'ADN cellulaire .

La figure 5 représente l'électrophorèse sur gel d'agarose de DNA extrait de PBMC de patients infectés par le virus HIV ou d'individus sains après culture durant une nuit dans un milieu de culture avec ou sans adjuvants.

Ces gels ont été obtenus par lyse dans 4 ml d'un tampon de lyse hypotonique (5 mM Tris pH 7,4, 5mM EDTA , 0,5 % Triton X100) de 15.10^6 cellules centrifugées à 200 g durant 10 mn. Les lysats sont ensuite centrifugés à 13.000 g durant 15 minutes . Le DNA des surnageants est concentré par précipitation à -20°C dans 50% d'isopropanol , 130mM NaCl. Après centrifugation à 13.000 g, les précipités sont séchés à l'air et resuspendus dans 10mM Tris pH 8, 1mM EDTA.

Tous les échantillons sont déprotéinisés par une extraction au phénol/chloroforme et une double extraction par un mélange chloroforme/alcool isoamylique (24:1). Après électrophorèse sur des gels fins d'agarose à 2% durant 12 heures à 30 V, le DNA est visualisé par coloration au bromure d'éthidium.

Le puits 1 de la figure 5 correspond au marqueur de poids moléculaire . Le puits 2 correspond au DNA de cellules PBMC d'individus sains incubés avec du PWM.

Les puits 3 à 11 correspondent au DNA de cellules PBMC de 7 patients infectés par le virus HIV incubés respectivement avec du milieu sans adjuvant (puits 3) , du milieu comprenant du PWM (puits 4 à 6, 8 et 9) , et du milieu comprenant du SEB (puits 10 et 11).

Les puits 3 et 4 correspondent au même patient.

La figure montre que les DNA des puits 4 à 6 et 8 à 11 ont un profil de dégradation caractéristique de l'apoptose, les bandes d'ADN dégradé étant des multiples de 200 paires de bases .

5 La dégradation de ces DNA est supprimée par addition de CsA au milieu contenant le PWM (colonne 7 correspondant au même patient que la colonne 6).

10 EXEMPLE 5-

Etat cellulaire des PBMC de patients infectés par le HIV .

15 La figure 6a représente une photographie en microscopie électronique de PBMC d'un patient infecté par le virus HIV après une incubation de 24 heures dans un milieu sans adjuvant.

La figure 6b représente les mêmes cellules incubées dans un milieu contenant 5 µg/ml de PWM.

20 Les cellules ayant différents degrés de concentration chromatique peuvent être observées sur cette figure et sont caractéristiques de l'apoptose. Les flèches sur cette figure les désignent .

EXEMPLE 6:

25 Effet de l'anticorps anti-CD28 sur la restauration de la capacité des lymphocytes à proliférer .

1') Récupération de la prolifération par co-stimulation par l'antigène tétanique et l'antigène grippal , en présence d'anti-CD28.

30 Des cellules de patients sont stimulées soit par la toxine tétanique (TT) soit par un antigène grippal (GP) en présence ou en l'absence de l'anticorps anti-CD28 .

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau I ci-après .

Ces résultats montrent que dans le cas de la toxine tétanique , la présence de l'anticorps anti-CD28 permet dans les cultures des lymphocytes desdits patients de restaurer la capacité à proliférer .

On retrouve ces résultats dans le cas de sept patients sur dix en présence d'antigène grippal (GP).

L'antigène grippal étant un antigène couramment rencontré , il est possible que les trois patients dont les lymphocytes ne prolifèrent pas en présence d'anticorps anti-CD28 , l'aient déjà rencontré , et que les cellules mémoires dirigées contre cet antigène aient été éliminées de ce fait .

2') Mise en évidence de la nécessité de la présence de l'anticorps anti-CD28 lors de la première stimulation pour la rééducation des cellules .

Des lymphocytes ont été stimulés (JO) après purification , par la toxine tétanique (TT) par la phytohémagglutinine (PHA) et par le mitogène pokeweed (PWM).

La prolifération est mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée au bout de 6 jours (j 6).

Parallèlement les cellules sont cultivées en présence de toxine tétanique ou du superantigène de l'entérotoxine staphylococcique B (SEB) avec ou sans anticorps anti-CD28.

Après 10 jours de culture , alors que les cellules sont revenues au repos , elles sont restimulées par les mêmes stimuli qu'à J 0 .

On observe quand la première stimulation de lymphocytes de patients infectés par le virus HIV a été effectuée en présence de TT ou de SEB sans CD28 ,

qu'il n'est pas possible de réobtenir une prolifération, même si ces lymphocytes sont restimulés par l'anticorps anti-CD28.

5 Par contre, les cellules précultivées en présence de l'anticorps anti-CD28 prolifèrent en présence des antigènes TT ou SEB.

Les résultats sont résumés dans le tableau II.

10 3') Restauration de la capacité des lymphocytes à proliférer en réponse au PWM et au SEB après une première stimulation par la PHA.

Des lymphocytes de patients infectés par le virus HIV sont stimulés soit directement (JO) avec la phytohémmagglutinine (PHA), le mitogène pockweed (PWM) ou l'entérotoxine staphylococcique B (SEB), ou
15 préstimulées par le PHA pendant 10 jours.

Les cellules sont restimulées après 10 jours dans les mêmes conditions qu'à JO.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau III.

20 On observe que la stimulation des cellules par un adjuvant tel que le PHA, PWM ou le SEB permet la restimulation au bout de 10 jours en présence de PHA.

EXEMPLE 7 :

25 Restauration de la capacité des lymphocytes à proliférer par stimulation par des cellules allogéniques.

La restauration de la capacité des lymphocytes à proliférer après une première stimulation par des cellules allogéniques et en réponse au PWM et au SEB a
30 été testée.

Parallèlement, on a testé la capacité à proliférer après une première stimulation par la PHA.

Les patients ayant subi une première stimulation par le PHA ou par les cellules

allogéniques (RLM ou réaction lymphocytaire mixte) sont restimulées après dix jours de culture (J10).

Le tableau IV ci-après illustre les résultats obtenus.

5 Ce tableau montre donc que par rapport au témoin, les cellules ayant subi une première stimulation par des cellules allogéniques présentent une prolifération équivalente à celles qui ont été stimulées par la PHA.

10

EXEMPLE 8 :

Comparaison des mécanismes d'apoptose dans des cellules normales et dans des cellules d'individus infectés par un virus HIV.

15 1) Etude de l'apoptose de cellules d'individus non infectés par le virus HIV.

On a testé la réponse de thymocytes médullaires totaux humains fixés par l'anticorps monoclonal CD3 et de sous-populations de thymocytes médullaires matures $CD4^+ CD8^-$ ou $CD8^+ CD4^-$.

20 Dans les trois populations , l'anticorps monoclonal CD3 n'induit pas la prolifération de thymocytes et conduit après 48 heures à la mort d'environ 50% des thymocytes , comme indiqué dans le tableau V ci-après.

25 Dans le tableau V, les réponses à la mobilisation des TCR de thymocytes totaux humains (A), de thymocytes $CD4^+ CD8^-$ (B) , de thymocytes $CD8^+ CD4^-$ (C) et de thymocytes immatures $CD4^- CD8^- CD3^-$ (D) ont été testées .

30 Les cellules ont été colorées avec un mélange d'anticorps CD4-FITC (LFL1 fluorescence verte) et d'anticorps CD8-RD (LFL2 fluorescence rouge) pour effectuer une analyse en cytofluorométrie de flux

(Coulter Epics Profile II) . La prolifération cellulaire après la mobilisation des TCR avec des anticorps CD3 liés sur une boîte, en présence ou en absence d'IL-2 (10 unités par ml), a été déterminée par incorporation de thymidine tritiée (^3H -TdR) . La thymidine a été ajoutée dans les dernières douze heures du troisième jour. Les résultats représentent la moyenne de culture en triplicate ou d'une expérimentation représentative parmi les trois . La mort cellulaire a été déterminée 48 heures après la stimulation par l'exclusion du bleu trypan . Les résultats et les pourcentages de mort cellulaire sont choisis parmi trois expériences .

La méthode utilisée a été la suivante . Des thymus ont été obtenus à partir d'enfants de moins de deux mois après une opération chirurgicale cardiaque . Les thymocytes ont été purifiés sur un tamis de Nylon et ont été congelés jusqu'à utilisation . Les thymocytes médullaires ont été isolés à partir d'une population de thymocytes totaux par sélection négative avec des billes magnétiques recouvertes d'un anticorps CD1 (D47, IgG1 à $1\mu\text{.ml}$), selon les instructions du fabricant (Biosys, France).

Les thymocytes $\text{CD4}^+ \text{CD8}^-$ ou $\text{CD8}^+ \text{CD4}^-$ ont été purifiés à partir de thymocytes médullaires par une sélection négative supplémentaire en utilisant respectivement l'anticorps monoclonal CD8 (L533 IgG1 à $1\mu\text{/ml}$) ou l'anticorps CD4 (O516, IgG1, à $1\mu\text{/ml}$) . Les essais de prolifération avec des anticorps monoclonaux fixés (OKT3, IgG2a) ou CD5 (A50, IgG2a) comme témoins ont été effectués . Pour déterminer la mort cellulaire , les cellules ont été récoltées après 48 heures par pipetage et diluées de moitié avec 0,1 % de bleu de trypan dans des tampons PBS.

Les cellules vivantes et les cellules mortes ont été comptées dans un hémocytomètre . Les résultats sont exprimés comme le pourcentage de cellules mortes.

Comme précédemment décrit (Nieto et al. J. Immunol. 145, 1364-1368,1990) , l'addition d'IL-2 empêche la mort cellulaire et permet une prolifération des thymocytes en présence d'anticorps CD3.

Les thymocytes médullaires ayant été isolés par une sélection négative , utilisant l'anticorps CD1a dans tous les cas , et les anticorps CD46 et CD8 dans les purifications supplémentaires , les trois populations cellulaires ont été contaminées par environ 20% de thymocytes immatures CD4⁻ CD8⁻ CD3⁻.

Comme l'indique le tableau V, ces thymocytes immatures quand ils sont purifiés ne meurent ni ne prolifèrent en réponse à l'anticorps CD3, en l'absence ou en présence d'IL-2.

La mortalité cellulaire due au CD3 des thymocytes médullaires totaux est associée à une fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose comme le montre la figure 7 C.

Cette figure est un gel d'électrophorèse en agarose d'ADN extrait de thymocytes médullaires après différents traitements . Les thymocytes médullaires ont été cultivés dans un milieu simple (colonne 1) ou ont été stimulés par l'anticorps CD3 lié (colonnes 4, 5 et 7) en présence de d'IL-1 recombinante (rIL-1) (10 U/ml, colonne 5), ou en présence d'anti-IFN gamma (dilution sérique 1/800, colonne 7).

Cette mort cellulaire est un procédé actif qui peut être empêché par la cycloheximine comme le montre la figure 7b et la cyclosporine A comme indiqué dans le tableau VI.

Comme montré dans le tableau VI et dans la figure 7d, l'apoptose due au CD3 de thymocytes médullaires est associée à l'expression des ARN messagers IFNgamma, à la sécrétion de l'IFNgamma, à l'expression de l'ARN messager de la chaîne P55 du récepteur de l'IL-2, à l'absence d'expression du gène de l'IL-2 et à l'absence de sécrétion de l'IL-2.

La figure 7d représente l'analyse en dot blot d'ARN de thymocytes médullaires stimulés avec un milieu simple (colonne 1), un milieu contenant de la rIL1 α (50 unités/ml, colonne 2), de l'anticorps CD3 lié (colonne 3) et de l'anticorps CD3 lié avec de la rIL1 α (colonne 4). L'autoradiogramme de l'IL-2 a été effectué après 6 heures. Les autoradiogrammes de l'IFNgamma, du récepteur à l'IL-2 et de la β -actine ont été effectués après 18 heures. Les sondes ont été testées sur un Northern Blot de RNA de thymocytes et chacune donne un signal spécifique sans hybridation croisée. Les tailles relatives des ARN messagers qui hybrident aux sondes sont en accord avec les valeurs préalablement publiées.

La sécrétion de l'IFNgamma à des niveaux élevés en l'absence de sécrétion d'IL-2 en réponse à l'anticorps CD3 a été aussi observée dans des thymocytes médullaires CD4⁺ CD8⁻ et CD8⁺ CD4⁻ comme le montre le tableau VI.

L'addition d'anticorps anti-IFNgamma empêche la mort des thymocytes due au CD3 (figure 7b) et la fragmentation de l'ADN (figure 7c), mais ne rétablit pas la prolifération thymocytaire à l'anticorps CD3 (figure 7a).

Par contre, l'IL-2 empêche la mort thymocytaire (figure 7b) et permet une prolifération

thymocytaire en réponse à l'anticorps CD3 (figure 7a).

5 Comme précédemment observé avec les cellules T-lymphocytaires , l'addition d'IL-1 aux thymocytes médullaires stimulés avec le CD3 permet l'expression d'ARN messagers de l'IL-2 (figure 7d) et la sécrétion d'IL-2 (tableau VI).

10 Ceci est associé à l'empêchement de la mort cellulaire (figure 7b) ou la fragmentation du DNA (figure 7c) et à la prolifération thymocytaire (figure 7a).

15 De manière curieuse l'IL-1 n'affecte pas l'expression des ARN messagers de l'IFNgamma (figure 7d) ni la sécrétion d'IFNgamma (tableau VI) en réponse à la stimulation par le CD3.

Ni l'IL-1 ni l'IL-2 n'induisent la prolifération cellulaire en l'absence de CD3 (figure 7a). L'IFNgamma n'induit pas de mort cellulaire en l'absence de CD3.

20 L'addition d'anticorps anti-IFNgamma à l'IL-2 et aux thymocytes médullaires $CD4^+ CD8^-$ et $CD8^+ CD4^-$ stimulée par le CD3 ont le même effet que dans le cas des thymocytes médullaires totaux (tableau VI). Dans le cas des thymocytes $CD8^+ CD4^-$ purifiés , l'IL-1 n'induit pas la sécrétion d'IL-2 et n'empêche pas la mort cellulaire en réponse au CD3 . Ceci suggère que l'effet préventif de l'IL-1 dans les thymocytes médullaires totaux est lié à la sécrétion d'IL-2 par les thymocytes $CD4^+ CD8^-$.

30 Les rôles respectifs de l'IFNgamma et de l'IL-2 dans la prolifération et la mort des thymocytes due au CD3 ont été de plus testés dans des expériences utilisant la ciclosporine A CsA , qui empêche l'apoptose des thymocytes et inhibe la sécrétion de

1'IL-2 et l'IFNgamma (tableau VI). Comme montré sur le tableau VI, l'IFNgamma et/ou l'IL-2 sont ajoutés à des thymocytes activés par le CD3 et traités par la CsA. Dans ces conditions, l'IFNgamma induit la mort des thymocytes, tandis que l'IL-2 induit la prolifération des thymocytes. Quand l'IFNgamma et l'IL-2 sont ajoutés ensemble, aucune mort cellulaire n'est observée et les thymocytes prolifèrent.

Ces résultats indiquent que la mobilisation par le CD3 entraîne dans le cas des thymocytes médullaires humains, une mort cellulaire qui est dépendante de l'IFNgamma, mais qui est inhibée par l'IL-2 même en présence d'IFNgamma.

Le tableau VII montre quant à lui, qu'un tel programme de mort cellulaire n'est pas restreint aux étapes de développement des cellules T, mais est aussi présent dans le cas de cellules T périphériques, activées et matures humaines. Une lignée cellulaire T CD4⁺ mature spécifique de l'antigène de la toxine tétanique se comporte comme des thymocytes médullaires humains quand elle est stimulée par l'anticorps CD3 en l'absence d'autres cellules. Comme montré aussi sur le tableau VII, l'addition d'IFNgamma et/ou d'IL-2 à des cellules mononucléaires périphériques activées par le CD3 et traitées par la CsA conduit aux mêmes résultats avec les lignées cellulaires T antigène-dépendantes et les thymocytes médullaires.

2) Apoptose dans des cellules d'individus infectés par un virus HIV.

Des expériences comparables ont été effectuées avec des lymphocytes T CD4⁺ d'un sujet infecté par le virus HIV.

Le tableau VIII ci-après montre que ni l'addition d'IL-2 ni l'addition d'anticorps anti-

Interféron gamma ne sont capables, contrairement à l'anticorps CD28, de prévenir l'apoptose de ces lymphocytes, ni de restaurer leur prolifération en réponse aux stimuli. L'IL-1 est aussi dépourvue d'effet.

La comparaison de ces résultats montre donc, que le mécanisme mis en jeu dans l'apoptose des sujets infectés par le virus HIV, se distingue de l'apoptose de cellules de patients non infectés par le virus HIV.

10

EXEMPLE 9 :

Induction in vitro dans des lignées lymphocytaires normales spécifique d'antigènes d'une apoptose équivalente à l'apoptose des cellules de patients infectés par un virus HIV.

On fait présenter un antigène (tétanos, grippe) à une lignée lymphocytaire T-CD4⁺ par des monocytes qui ont été préincubés avec un virus HIV. La présentation de l'antigène se déroule en présence d'AZT pour éviter l'infection des lymphocytes T-CD4⁺. Une réponse proliférative lymphocytaire normale s'ensuit.

Par contre, lorsque l'antigène est représenté une deuxième fois aux lymphocytes T-CD4⁺ par des monocytes, même non infectés par le virus HIV, les lymphocytes meurent d'apoptose au lieu de proliférer.

Ces résultats sont présentés dans les tableaux IX et X ci-après.

Comme l'apoptose des lymphocytes de sujets infectés par le virus HIV, l'apoptose observée lors de la deuxième stimulation est empêchée par l'anticorps CD28, mais ni par l'IL-2 ni par les anticorps anti-Interféron gamma.

Ces résultats montrent donc qu'un contact entre des lymphocytes T-CD4⁺ normaux et des monocytes infectés par un virus HIV amorce dans les lymphocytes T-CD4⁺, en l'absence d'infection par un virus HIV, un programme d'apoptose en réponse à une stimulation ultérieure.

Ce modèle cellulaire permet :

a) d'étudier dans un nombre très important de lymphocytes T-CD4⁺ normaux les mécanismes d'induction d'un phénomène d'apoptose comparable à l'apoptose observée chez les sujets infectés par un virus HIV.

b) d'étudier les agents thérapeutiques permettant de corriger ce phénomène d'apoptose;

c) d'identifier la ou les protéines virales en cause dans l'amorçage du programme d'apoptose;

d) de trouver des agents thérapeutiques permettant non plus seulement d'empêcher les cellules déjà anormales de mourir mais d'empêcher aux lymphocytes d'apprendre à mourir en réponse à une stimulation ultérieure.

EXEMPLE 10:

Comparaison de l'apoptose des cellules humaines induites par le virus HIV et de l'apoptose de cellules simiesques induites par le virus SIV.

Afin de comparer l'apoptose induite par le virus HIV chez les lymphocytes T, à d'autres infections virales, différents modèles, virus-hôte ont été étudiés chez les singes.

Ces modèles sont les suivants :

- chimpanzés, expérimentalement infectés par le virus HIV; ces animaux ne développent pas de maladies;

- macaques rhésus , expérimentalement infectés par le virus HIV (Simian Immuno Deficiency virus) ; ces animaux développent un SIDA ;

5 - singes verts d'Afrique naturellement infectés par le virus SIV ; ces animaux ne développent pas de maladie .

10 La figure 8 représente un gel d'électrophorèse d'ADN de cellules T de chimpanzés infectés par le virus HIV et incubés avec du SEB (colonnes 1 à 4) et de chimpanzés témoins c'est-à-dire de chimpanzés non infectés par le virus HIV mais dont les cellules T ont été incubées avec le SEB (colonnes 5 et 6).

15 Cette figure montre que, l'apoptose qui est caractérisée par une dégradation de l'ADN , n'a été détectée dans aucun des chimpanzés étudiés .

20 La figure 9 correspondant à des gels effectués avec l'ADN de cellules T de macaques témoins stimulées avec le SEB (colonnes 1 et 2) , de macaques infectés par le virus SIV et dont les cellules ont été incubées dans des milieux simples (colonnes 3, 5 et 7) et de macaques infectés par le virus SIV et dont les cellules ont été incubées avec du SEB (colonnes 4, 6 et 8) montre qu'il y a dégradation de l'ADN et donc apoptose chez les cellules des macaques infectés par le virus SIV lorsqu'elles sont incubées avec du SEB.

25 La figure 10 montre que le singe vert d'Afrique infecté par le virus SIV ne développe pas d'apoptose . Sur cette figure , les colonnes 1 à 4 correspondent à l'ADN de cellules T de macaques infectés par le virus SIV incubées avec du milieu simple (colonnes 1 et 3) ou avec du SEB (colonnes 2 et 4) tandis que les colonnes 5 à 7 correspondent à des cellules T de singes Verts d'Afrique infectés avec du virus SIV, incubées avec du SEB et les colonnes 8

et 9 correspondent à des cellules T de singes verts d'Afrique témoins , non infectés par du SIV , incubées avec le SEB.

5 Seuls les macaques infectés par le virus SIV reproduisent un phénomène comparable à celui observé chez l'homme avec le virus HIV .

10 Cet animal est donc un modèle intéressant pour sélectionner des agents thérapeutiques capables de prévenir l'apoptose et la survenue de la maladie . Cet animal est d'autant plus intéressant, que contrairement à l'homme ou le SIDA se déclare en dix ans , le macaque infecté par le virus SIV présente la particularité de développer un SIDA en six mois à un an et demie .

15 CONCLUSION:

20 Une caractéristique essentielle de l'apoptose est que la mort cellulaire dépend d'une activation de la cellule , de la transcription des gènes et de la synthèse des protéines dans les cellules mourantes . L'activation des cellules T de patients infectés par le virus HIV après addition de PWM est montrée par l'expression des mRNA p55 correspondant aux récepteurs à l'interleukine-2 à des niveaux équivalents et avec des cinétiques équivalentes à celle observée dans des

25 cellules T d'individus sains (figure 4) .

30 De plus , l'addition d'un inhibiteur de synthèse protéique (la cycloheximide) ou de cyclosporine A empêche l'apoptose des cellules T des patients infectés par le virus HIV stimulées par le PWM ou le SEB (figure 2a et figure 3) .

Il est à noter que parmi les stimulis qui induisent l'apoptose dans des thymocytes immatures normaux , et parmi les co-sigaux qui empêchent ce

processus , seul un nombre limité a le même effet vis-à-vis de cellules T de patients infectés par le HIV.

Dans les thymocytes immatures , la plupart des stimuli induisant la prolifération de cellules T adultes normales , incluant l'anticorps CD3 , conduisent à l'apoptose, et l'addition de co-sigaux tels que l'interleukine-1, l'interleukine-2 ou des esters de phorbol évite non seulement l'apoptose mais permet aussi une prolifération en réponse au stimuli .

Dans les cellules T de patients infectés par le virus HIV, l'anticorps CD3 induit la prolifération cellulaire et parmi les divers co-sigaux (Interleukine 1, Interleukine 2, Interféron gamma , anticorps CD5, CD28, CD 43, CD44 et CD 45R ou ester de phorbol) qui ont été ajoutés aux cellules T de patients infectés par le virus HIV, seul l'anticorps CD28 évite la mort induite par le PWM et le SEB et restaure la prolifération au PWM , au SEB et au TT (figure 1b et figure 2a) .

Sans que cette interprétation puisse être considérée comme une restriction à la présente invention , l'ensemble des résultats semble indiquer que les cellules CD4 T_H des patients infectés par le virus HIV sont programmées in vivo pour un procédé de suicide par apoptose après une activation par une stimulation définie , incluant la mobilisation des récepteurs des cellules T (TCR) par les molécules présentées par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II.

Etant donné que les anticorps anti-CD28 rétablissent la possibilité de proliférer après stimulation par l'antigène TT, les cellules T spécifiques du tétanos semblent présentes chez les patients infectés par le virus HIV. Quoique de telles

cellules sont trop rares pour permettre une mise en évidence de leur mort . l'induction de l'apoptose semble être le mécanisme le plus probable pour expliquer leur absence de réponse in vitro .

5

Chez les patients infectés par le HIV, moins de 0,1% des cellules T CD4 du sang périphérique sont infectées par le HIV , ce qui exclut la possibilité que l'apoptose soit due directement à l'infection des cellules .

TABEAU I
Récupération de la prolifération à l'antigène tétanique
et à l'antigène grippal

Patient N°	CD28	TT	TT+CD28	GP	GP+CD28
27	321	857	6789	321	642
50	133	254	3540	478	361
67	117	266	1617	297	189
28	244	522	15259	521	17621
52	200	478	1852	521	3218
58	81	76	4079	316	11613
54	154	284	1943	581	3194
44	432	562	4681	1916	3186
66	43	530	1218	1648	3250
68	540	730	1602	4140	2691

TABLEAU II
Délétion des clones spécifiques et restauration des lymphocytes T
spécifiques par addition de l'anti-CD28

Milieu de culture	milieu seul	milieu de restimulation + TT	+ TT+CD28	+PHA	+PWM
Patient 1 JO	521	285	1076		
P1 TT+CD28	265	4568	12716		
Patient 2 JO	350	157	1549		
P2 TT	103	883	342		
P2 TT+CD28	362	6167	17958	18616	219
P2 SEB	63	72	112	28617	3237
P2 SEB+CD28	127	1119	1843		
Témoin JO	680	3930	3290		
T TT	569	7091	4382		
T TT +CD28	618	8882	5416	27341	6721
T SEB	128	3150	4102	13247	
T SEB+CD28	147	1397	7110		3127

FEUILLE DE REMPLACEMENT

TABLEAU III
Restauration de la capacité des lymphocytes à proliférer
en réponse au PWM et au SEB après une première stimulation par la PHA

	Milieu sans sans adjuvant	Milieu de stimulation + PHA	+ PWM	+ SEB
Patient 1 JO	405	12443	727	1024
P1 (PHA) J10	163	14130	3178	11206
Patient 2 JO	177	14987	305	682
P2(PHA) J10	387	24103	18029	22785
Patient 3 JO	251	9070	545	3999
P3 (PHA)J10	124	12192	2152	15303
Patient 4 JO	529	14714	1660	2141
P4 (PHA) J10	429	20035	3760	16347

TABLEAU IV
Restauration de la capacité des lymphocytes à proliférer en réponse
au PWM et au SEB après une première
stimulation par le PHA ou par des cellules allogéniques

	milieu sans stimulus	Milieu de stimulation + PHA	+ PWM	+SEB
Patient 1 JO	139	13.750	1.751	5.562
P1 (PHA) J10	384		16.279	19.383
P1(RLM) J10	2033		12.444	17.378
P2 (JO	365	15.464	1.617	4.676
P2 (RLM) J10	564		6.092	10.797

TABLEAU V

Apoptose de cellules non-infectées par le virus HIV

Type cellulaire	Prolifération (10^2 cpm)				Mortalité en %			
	Milieu seul	Milieu +IL2	CD3	CD3 +IL2	Milieu seul	Milieu +IL2	CD3	CD3 +IL2
Thymocytes $CD1^-$ (A)	8,3	8,2	9,5	184	9	7	47	12
Cellules $CD4^+CD8^-$ (B)	9,1	7,4	8,4	266	8	8	49	11
Cellules $CD4^-CD8^+$ (C)	5,4	5,3	7,1	237	6	7	51	13
Cellules $CD3^-CD4^-$ $CD8^-$ (D)	1,2	21	8,5	28	20	18	17	18

TABEAU VI
Prolifération des thymocytes médullaires, mort cellulaire, sécrétion
d'IFNgamma et de l'IL-2 en réponse à l'anticorps CD3 .

Type cellulaire	Stimuli	Prolifération (cpm)	% mortalité	IL2 pg/ml	IFNgamma pg/ml
thymocytes matures	milieu seul	223+37	5	<10	<10
	CD3 mAb	206+52	53	<10	3204
	CD3 mAb+ IL1	22631 ± 1105	7	754	3280
	CD3 mAb+IL2	35100+1237	6	-	2845
	CD3 mAb+αIFNgamma	114+89	14	-	-
	CD3 mAb+Csa	186+41	6	<10	<10
	CD3 mAb+Csa+IL2	21817+943	6	-	<10
	CD3 mAb+Csa+ IFNgamma	328+127	57	<10	-
	CD3 MAb+Csa+IL2 IFNgamma	18743+1985	13	-	-
	milieu seul	138+54	4	<10	<10
CD4 ⁺ CD8 ⁻ thymocytes matures	CD3 mAb	286+84	50	<10	2491
	CD3mAb+ IL	24141+1353	12	923	2726
	CD3 mAb+IL2	34158+1843	6	-	3123
	CD3 mAb+αIFNgamma	155+42	18	-	-
	CD3 mAb+Csa	140+47	6	<10	<10
	CD3 mAb+Csa+IL2	20483+1157	5	-	<10
	CD3 mAb+Csa+IFN gamma	137+48	64	<10	-
	CD3 mAb+Csa+IL2+ IFNgamma	18402+754	12	-	-
	milieu seul	138+54	4	<10	<10
	CD3 mAb	286+84	50	<10	2491

TABLEAU VI (suite)
 Prolifération des thymocytes médullaires, mort cellulaire, sécrétion
 d'IFNgamma et de l'IL-2 en réponse à l'anticorps CD3 . Effet de la
 cyclosporine A

Type cellulaire	Stimuli	Prolifération (cpm)	mortalité %	IL2 pg/ml	IFNgamma pg/ml
CD8+CD4- thymocytes matures	milieu seul	140±51	5	<10	<10
	CD3 mAb	169±69	59	<10	3047
	CD3 mAb+IL1	393±134	50	<10	3187
	CD3 mAb+IL2	17891±1345	9	-	3274
	CD3 mAb+α	155±41	16	-	-
	IFNgamma				
	CD3 mAb+C8A	137±87	4	<10	<10
	CD3 mAb+C8A+IL2	18673±1078	7	-	<10
	CD3 mAb+C8A+ +IFNgamma	147±71	70	<10	-
	CD3 mAb+C8A +IL2+IFNgamma	20743±1345	13	-	-

Des thymocytes médullaires ont été purifiés et cultivés comme décrit préalablement avec : de l'anticorps CD3 (OKD3) fixé, de l'Interleukine 1 recombinante (RIL-1 α, 50 unités/ml), de l'Interleukine 2 IL-2 (10 unités/ml, Boehringer Mannheim) de l'IFNgamma recombinante (rIFNgamma, 100 unités/ml) , en l'absence ou en présence de cyclosporine A (200 ng/ml, SANDOZ, FRANCE).

La prolifération cellulaire a été déterminée par l'incorporation de thymidine tritiée (³H-TdR), la thymidine ayant été ajoutée dans les dernières douze heures du 3ème jour . Les résultats sont exprimés comme la moyenne de culture en triplicate plus ou moins les écarts types . La mortalité cellulaire a été détectée par l'exclusion du bleu de trypan et a été testée 48 heures après l'activation . La sécrétion des lymphokines a été testée dans les surnageants collectés après 48 heures en utilisant le kit ELISA commercialisé par la Société GENZYME. Les résultats sont la moyenne de duplicate d'une expérimentation représentative parmi trois pour chaque population cellulaire.

TABLEAU VII

prolifération, mort cellulaire, sécrétion d'Interféron gamma et d'Interleukine -2
par une lignée cellulaire T antigène dépendante ou par des PBMC en réponse à
l'anticorps CD3.

type cellulaire	Stimuli	Prolifération (cpm)	% mortalité	IL2 pg/ml	IFN gamma pg/ml
lignée cellulaire T	milieu seul	845±451	9	51	34
	CD3 mAb	4012±843	62	43	2840
	CD3 mAb+IL1	31470±1540	5	813	3074
	CD3 mAb+IL2	43570±2047	9	-	1742
	CD3 mAb+	4982±681	17	-	-
	+ αIFNgamma				
	CD3 mAb+Csa	128±19	6	<10	<10
	CD3 mAb+Csa+IL2	19650±1327	5	-	<10
	CD3 mAb+Csa+	1073±237	70	<10	-
	+IFNgamma				
	CD3 mAb+Csa+IL2	17403± 1203	21	-	-
	+ IFNgamma				

TABLEAU VII (suite)

Prolifération, mort cellulaire, sécrétion d'Interféron gamma et d'Interleukine-2 par une lignée cellulaire T antigène dépendante ou par des PBMC en réponse à l'anticorps CD3.

type cellulaire	Stimuli	Prolifération (cpm)	% mortalité	IL2 pg/ml	IFN gamma pg/ml
PBMC	milieu seul	317+38	3	<10	<10
	CD3 mAb	34879+2587	4	1267	3874
	CD3 mAb+CsA	354+89	4	<10	<10
	CD3 mAb+CsA+IL2	28745+3478	3	-	<10
	CD3 mAb+CsA+	356+58	68	<10	-
	IFNgamma	31478+2698	5	-	-

Une lignée cellulaire T spécifique de la toxine tétanique et des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été purifiées et cultivées telles que décrit pour le tableau VI. La prolifération cellulaire a été déterminée par incorporation de thymidine tritiée, la thymidine ayant été ajoutée dans les dernières douze heures du troisième jour pour les PBMC, et dans les dernières huit heures du deuxième jour pour la lignée cellulaire. La mort cellulaire a été détectée par l'exclusion du bleu trypan et a été testée 48 heures après activation pour les PBMC ou 24 heures après activation pour la lignée cellulaire T. La sécrétion des lymphokines a été mesurée à l'aide du kit ELISA GENZYME dans les surnageants collectés après 48 heures pour les PBMC ou 24 heures pour la lignée cellulaire T.

TABLEAU VIII
Effet de l'IL-2 et d'anticorps anti-Interféron gamma sur l'apoptose et la prolifération cellulaire de cellules T de patients infectés par le virus HIV

	prolifération (cpm)		mortalité(%)	
	milieu PWM seul	SEB	milieu seul	PWM SEB
Patient 1	137	841	4	37
+IL2	294	1234	5	32
+αIFNgamma	235	776	6	28
+CD28	196	7631	6	13
		27280		9
Patient 2	141	432	5	36
+IL2	121	521	4	28
+αIFNgamma	169	380	6	31
+CD28	217	1513	6	17
		17031		11
Patient 3	152	938	5	34
+IL2	110	608	5	37
+αIFNgamma	421	760	6	31
+CD28	321	5608	5	13
		17763		23
				21
				20
				11

TABLEAU IX
Réponse proliférative lymphocytaire induite par des antigènes présentés par des
monocytes infectés par le virus HIV .

Millieu	Prolifération (cpm)	monocytes	HIV-monocytes
milieu simple	1057	2540	1587
antigène (Ag)	2354	47894	5873
Ag+IL2	12458	57486	4587
Ag+αIFNgamma	2017	43215	3654
Ag+CD28	2036	41256	37845

TABEAU X
Effet d'une seconde présentation des antigènes par des monocytes non-infectés sur l'apoptose des lymphocytes

Milieu	Mortalité %	Première stimulation par monocytes	Première stimulation par HIV-monocytes
milieu simple	15	13	17
Antigène (Ag)	14	12	13
Ag+IL2	9	15	16
Ag+αIFNgamma	8	17	19
Ag+CD28	7	19	31

Préincubation: Les lymphocytes TCD4⁺ sont stimulés par l'antigène présenté par des monocytes non infectés ou infectés par HIV.

Seconde activation: Les lymphocytes TCD4⁺ sont restimulés par l'antigène présenté par des monocytes non infectés.

Ag: Antigène (tétanos); αIFNgamma: anticorps anti-Interférongamma ;
CD28: anticorps monoclonal CD28.
(N.B.: l'étape de préincubation est faite en présence d'AZT, qui empêche l'infection des lymphocytes TCD4⁺ PAR HIV)

TABLEAU XI
Prolifération de cellules mononucléaires et de cellules CD4⁺ ou CD8⁺ purifiées de
macaques asymptomatiques infectés par le virus SIV et de macaques témoins

Prolifération (cpm)	milieu	ConA	PWM	SEB	SEB+CD28
SIV ⁻ PBL ⁺	401	43991	24732	26873	29872
SIV ⁻ CD4 ⁺	194	29509	39341	43294	46517
SIV ⁻ CD8 ⁺	111	19356	10521	11711	12121
SIV ⁺ PBL ⁺	109	5121	2319	1917	12123
SIV ⁺ CD4 ⁺	237	10765	28634	3187	19991
SIV ⁺ CD8 ⁺	763	12212	23989	26621	28330

TABLEAU XII
Induction de la mortalité chez des cellules de macaques préalablement activées .

Mortalité (en %) cellules mortes	milieu	ConA	PWM	SEB	SEB+CD28
SIV ⁻ PBL ⁺	6	5	2	4	3
SIV ⁻ CD4 ⁺	3	4	2	4	3
SIV ⁻ CD8 ⁺	4	4	5	2	3
SIV ⁺ PBL ⁺	9	46	35	19	7
SIV ⁺ CD4 ⁺	8	40	29	21	12
SIV ⁺ CD8 ⁺	10	10	9	7	8

46

FEUILLE DE REMPLACEMENT

REVENDICATIONS

1. Médicament contenant un agent inhibant in vivo l'apoptose pathologique , ledit agent pouvant être sélectionné par un procédé comprenant au moins les étapes de:

5 - mise en contact d'au moins deux préparations cellulaires d'un patient infecté par un rétrovirus avec un agent d'activation cellulaire , tel que du mitogène pokeweed, respectivement en présence et en absence dudit agent , et

10 - comparaison de la prolifération et/ou de la mortalité des deux préparations cellulaires .

2. Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent est capable de bloquer la réception ou la transduction de signaux conduisant au suicide des cellules .

3. Médicament selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent est capable d'inhiber l'activation d'une endonucléase nucléaire entraînant la fragmentation du génome de la cellule .

4. Médicament selon la revendication 1 , caractérisé en ce que l'agent apporte ou génère un co-signal permettant à la cellule de se différencier et de se multiplier normalement.

5. Médicament selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent à lui seul entraîne la prolifération et la différenciation cellulaires et génère des cellules qui ont perdu la capacité à se suicider dans des conditions pathologiques .

6. Médicament selon la revendication 1 , caractérisé en ce que l'agent est capable d'inhiber les signaux qui rendent une cellule susceptible de répondre par une apoptose pathologique à une activation .

7. Médicament selon la revendication 2 ,
contenant de la cyclosporine , ou un inhibiteur de
synthèse protéique tel que la cycloheximide .

5 8. Médicament selon la revendication 4
contenant un anticorps anti-CD28 ou une association
d'un agent entraînant la stimulation de la
phosphokinase C , tel qu'un ester du phorbol , avec
l'interleukine I.

10 9. Médicament selon la revendication 5
contenant un agent mitogène tel que la
phytohémagglutinine (PHA) , des cellules allogéniques
irradiées , un anticorps anti-CD2 ou un anticorps
anti-CD3.

15 10. Médicament selon l'une des revendications
1 à 9, caractérisé en ce qu'il est destiné au
traitement et à la prévention des maladies liées aux
rétrovirus et en particulier liées aux lentivirus ,
tels que les virus HIV chez l'homme et SIV, FIV, BIV ,
VISNA et CAEV chez l'animal .

20 11. Composition pharmaceutique caractérisée en
ce qu'elle contient une quantité pharmaceutiquement
efficace d'un agent tel que défini dans l'une des
revendications 1 à 9 en association avec un ou
plusieurs diluants ou adjuvants pharmaceutiquement
25 acceptables .

30 12. Composition pharmaceutique selon la
revendication 11 , caractérisée en ce qu'elle est
destinée au traitement et à la prévention des maladies
liées aux rétrovirus et en particulier liées aux
lentivirus , tels que les virus HIV chez l'homme et
SIV, FIV , BIV, VISNA et CAEV , chez l'animal .

13. Utilisation d'un agent tel que défini dans
l'une des revendications 1 à 9 pour l'obtention d'un
médicament destiné au traitement et à la prévention

des maladies liées aux rétrovirus et en particulier liées aux lentivirus , tels que les virus HIV chez l'homme et SIV, FIV, BIV, VISNA et CAEV chez l'animal.

5 14. Méthode de détermination de la déficience qualitative du répertoire immunologique d'un individu vis-à-vis d'un agent infectieux comprenant au moins les étapes de :

- stimulation in vitro des lymphocytes dans un milieu contenant au moins un anticorps anti-CD28 en présence d'un ou plusieurs antigènes spécifiques de l'agent infectieux, et
- mesure de la cinétique de prolifération des lymphocytes .

15 15. Méthode de détermination de la capacité des lymphocytes d'un individu à répondre à l'agression par un agent infectieux comprenant au moins les étapes de :

- stimulation in vitro des lymphocytes dans un milieu contenant au moins un anticorps anti-CD28 en présence d'un ou plusieurs antigènes spécifiques de l'agent infectieux, et
- mesure de la cinétique de prolifération des lymphocytes .

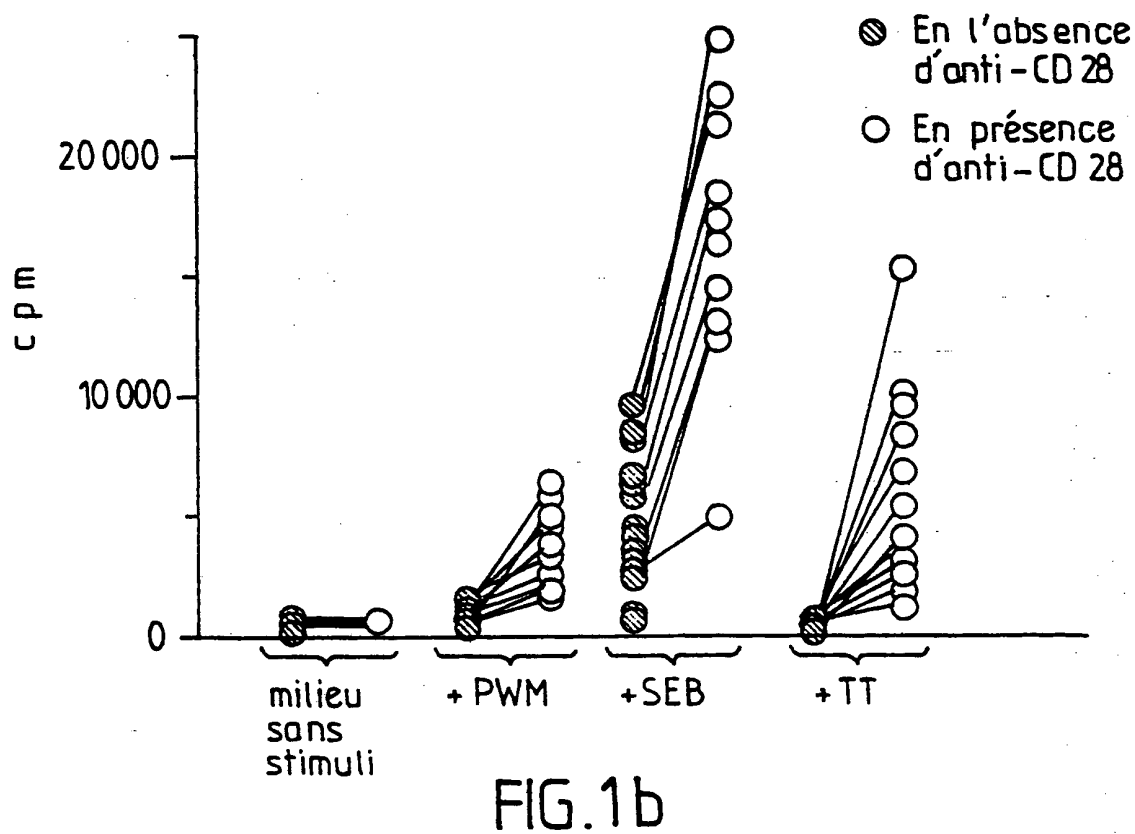
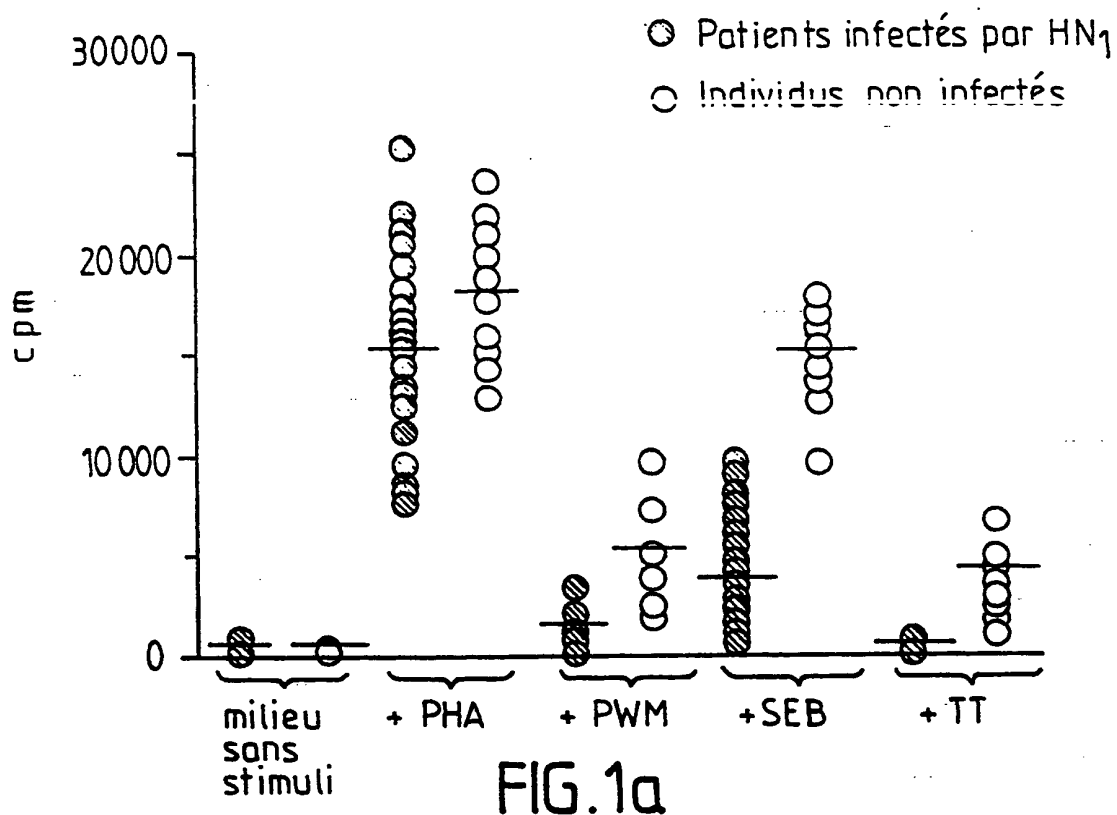
25 16. Méthode de stimulation in vitro de lymphocytes issus de patients atteints d'une maladie liée aux rétrovirus par traitement des lymphocytes isolés par un anticorps anti-CD28.

30 17. Méthode de sélection d'un agent inhibant in vivo l'apoptose pathologique comprenant au moins une étape de mise en contact de cellules infectées par un lentivirus , tel qu'un virus HIV avec un antigène respectivement en présence et en absence dudit agent et, consécutivement de stimulation par ledit antigène.

18. Méthode de sélection d'un agent inhibant
in vivo l'apoptose pathologique comprenant au moins :

- une première présentation d'un antigène par
des monocytes préincubés avec un rétrovirus, à une
5 lignée cellulaire de lymphocytes T CD4⁺,
- une seconde présentation de l'antigène par
des monocytes , éventuellement préincubés avec un
rétrovirus, à la lignée cellulaire de lymphocytes T
CD4⁺,
- 10 - estimation de la mort et/ou de la
prolifération des lymphocytes .

1/10



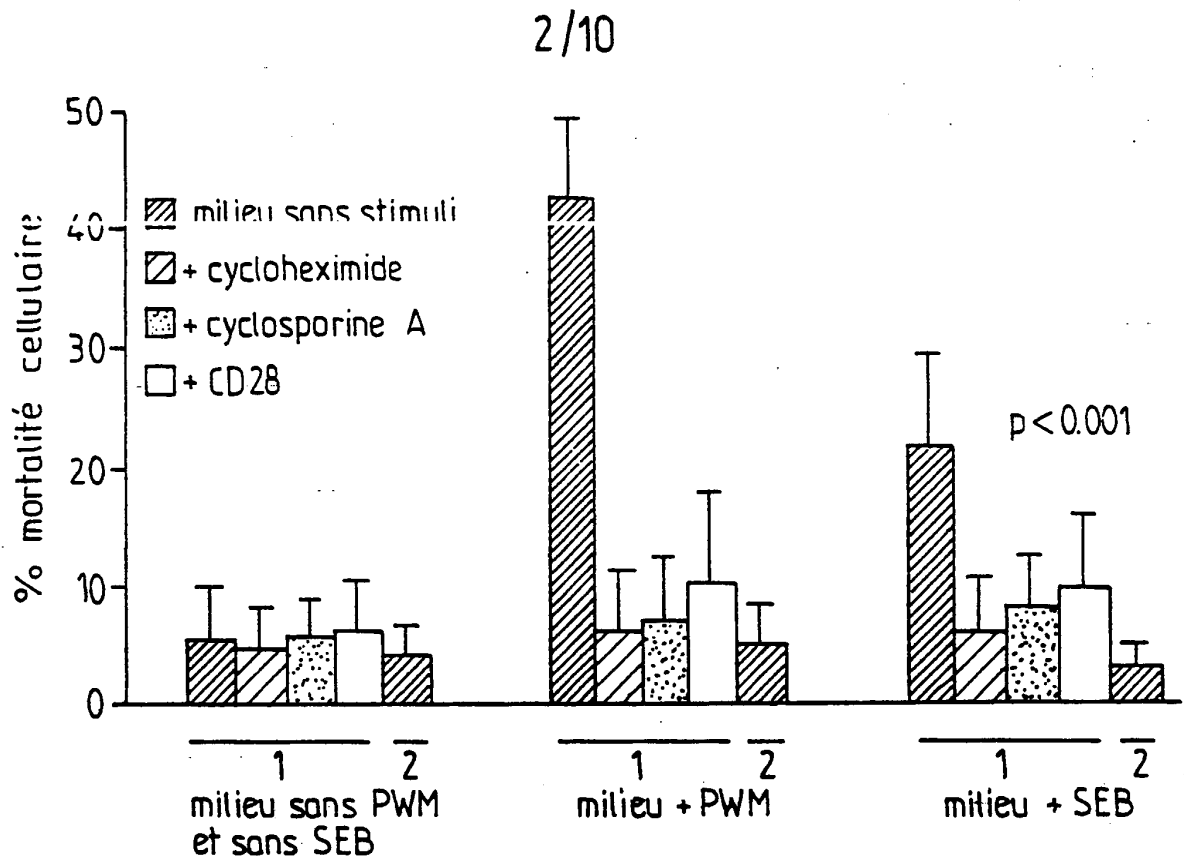


FIG. 2a

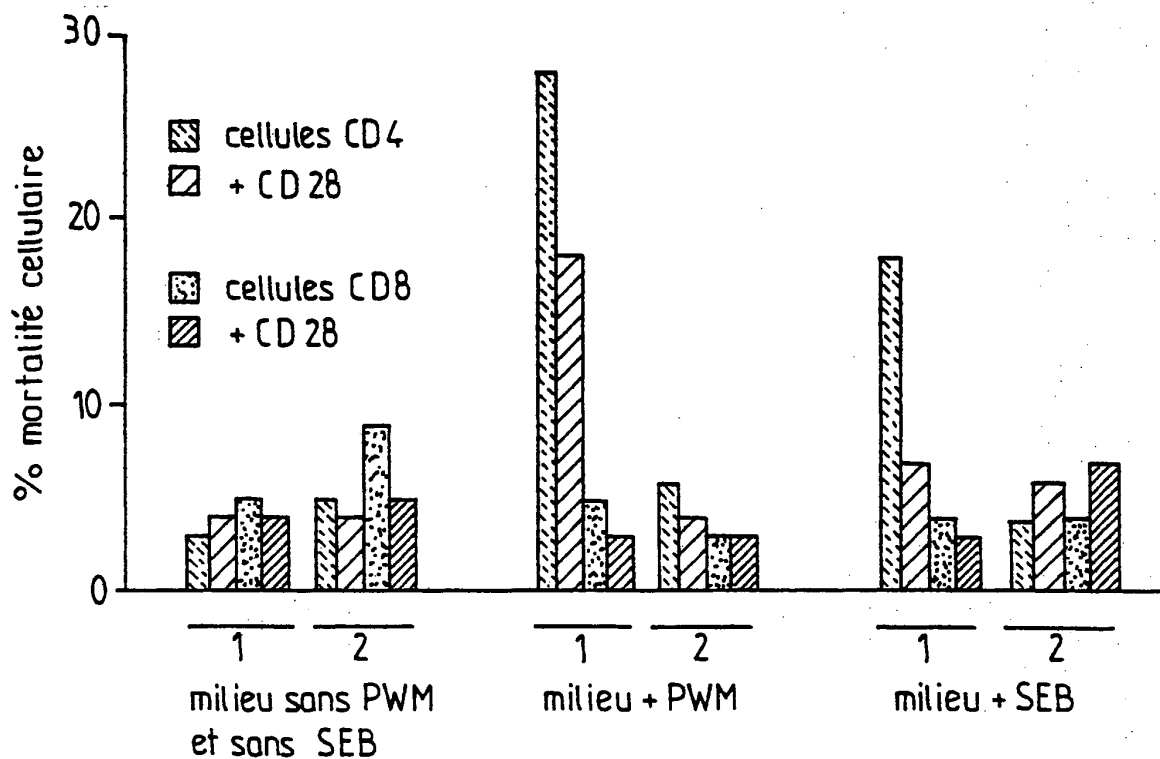


FIG. 2b

3/10

FIG. 3

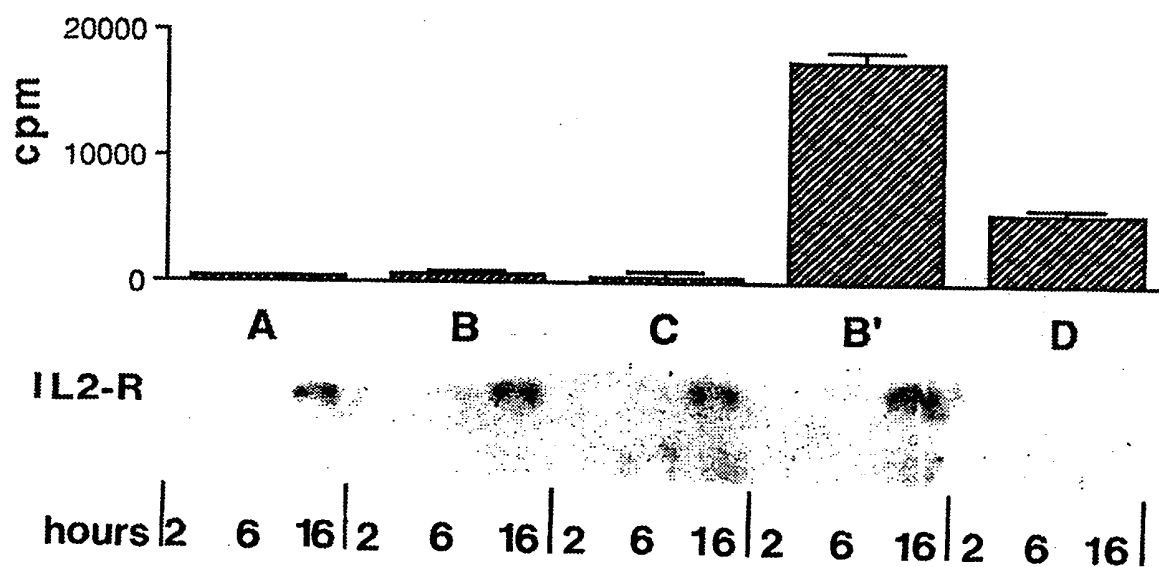


FIG. 4

4/10

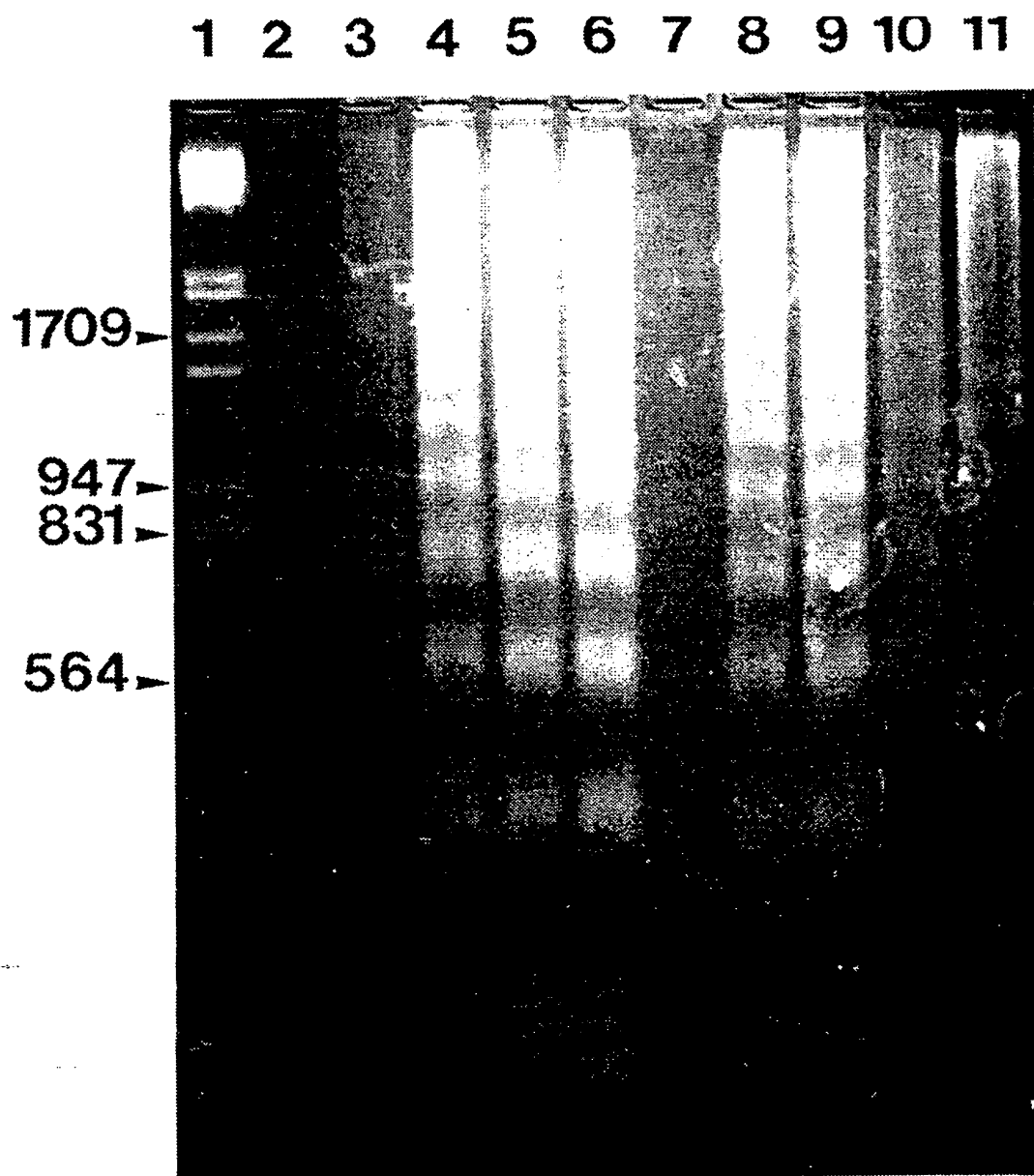


FIG.5

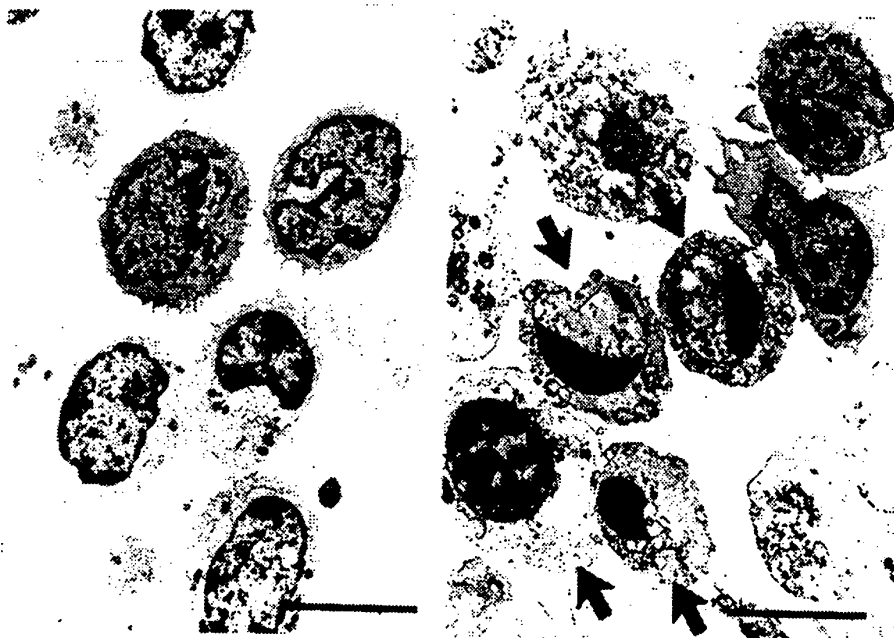
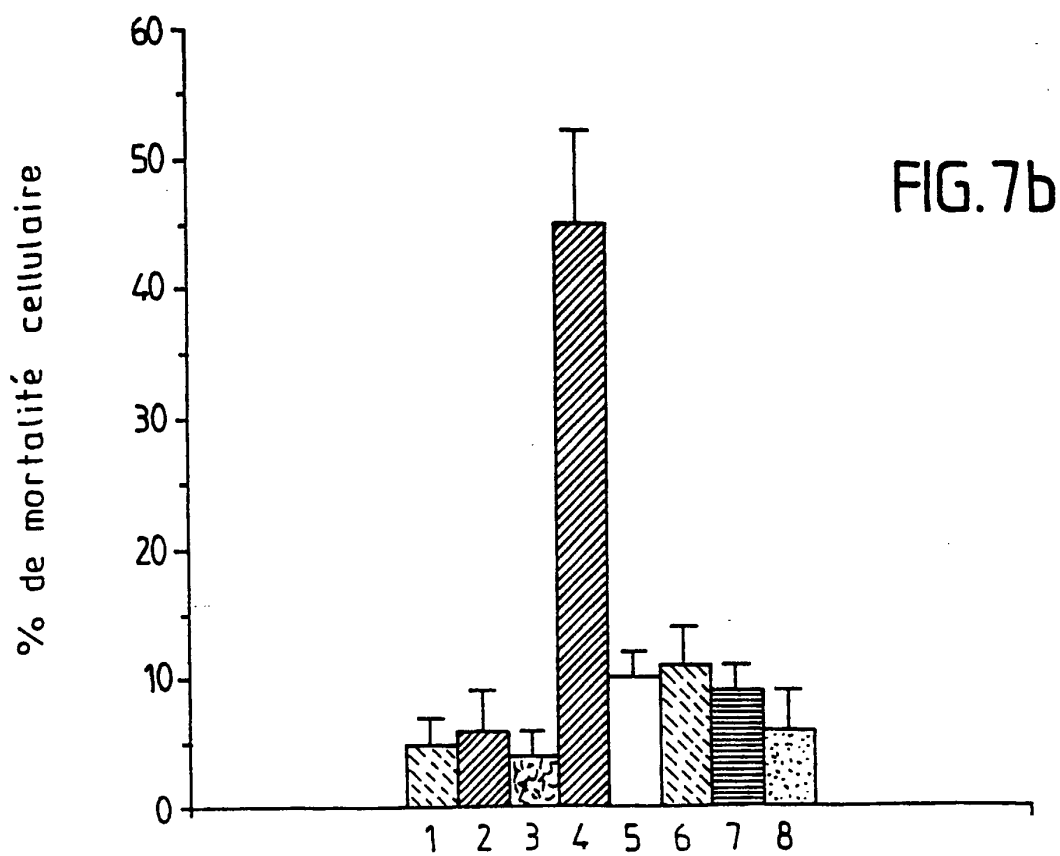
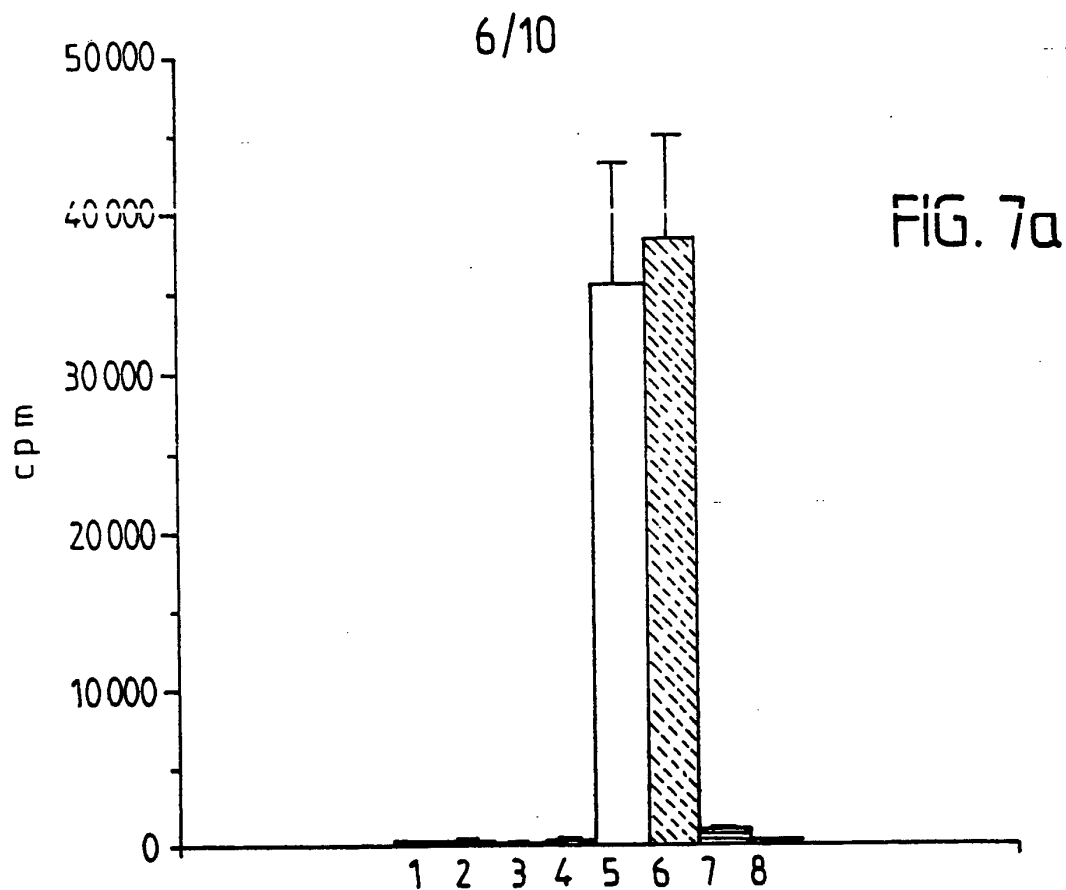


FIG. 6a

FIG. 6b



7/10



FIG. 7c

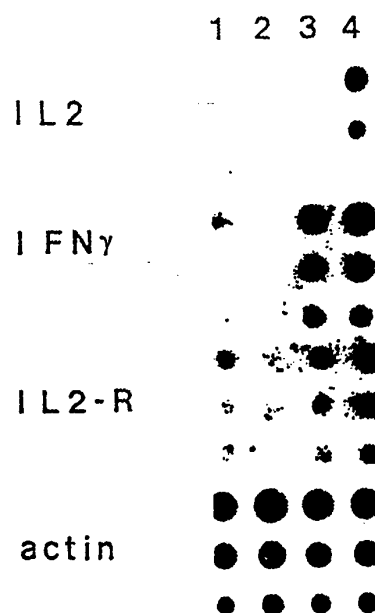


FIG. 7d

8/10

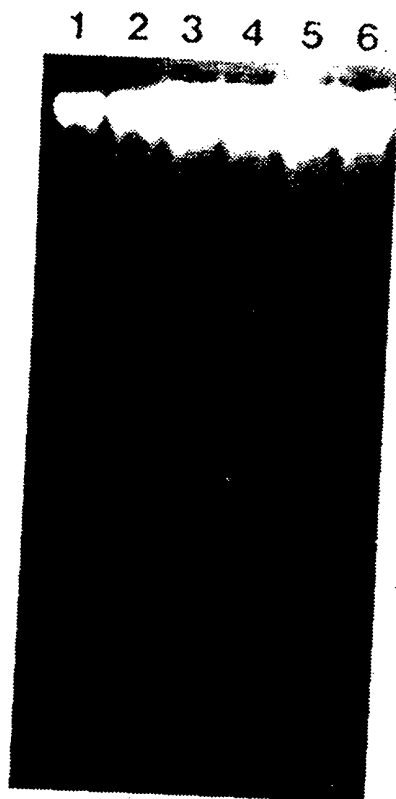


FIG. 8

FEUILLE DE REMPLACEMENT

9/10

1 2 3 4 5 6 7 8

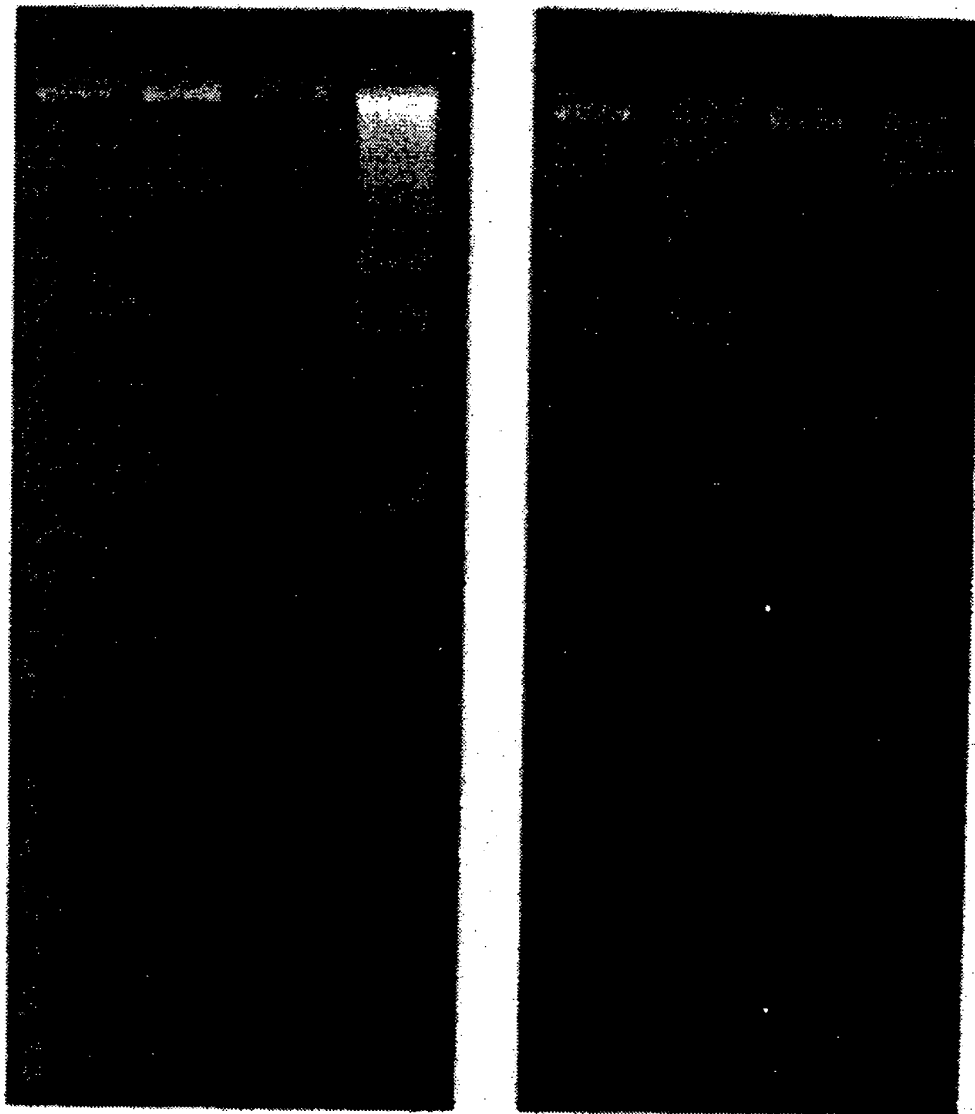


FIG. 9

FEUILLE DE REMPLACEMENT

10/10

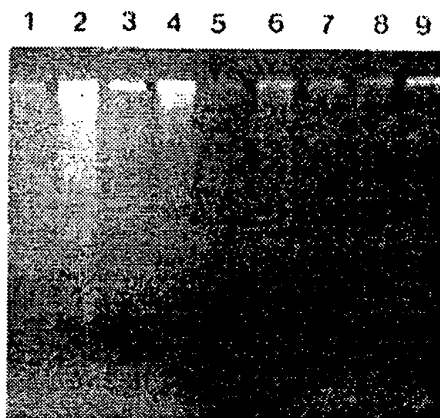


FIG.10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR92/00265

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. ⁵ : A61K37/02; A61K31/45; A61K39/395; A61K37/46
 A61K35/12; A61K31/645; C12Q1/02; C12N5/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. ⁵ : A61K; C07K; C12Q; C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, A, 4 814 323 (J.M. ANDRIEU ET AL.) 21 March 1989, see the whole document	1-3,6,7,10-13
X	NATURE. Vol.339, 22 June 1989, LONDON GB pages 625-626; Y. SHI ET AL.: 'CYCLOSPORIN A INHIBITS ACTIVATION- INDUCED CELL DEATH IN T-CELL HYBRIDOMAS AND THYMOCYTES' see the whole document	1-3,6,7,10-12
X	US, A, 4 427 684 (R.O. ORES) 24 January 1984, see the whole document	1-3,6,7,10-12
X	WO, A, 9 005 541 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN ET AL.) 31 May 1990, see page 2, line 18 - page 3, line 32; claims	1,4,8,10-13
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 265, No.6, 25 February 1990, BALTIMORE US pages 3009-3011; D.J. MCCONKEY ET AL.: 'INTERLEUKIN 1 INHIBITS T	1,4,8,10-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 July 1992 (29.07.92)

Date of mailing of the international search report

5 August 1992 (05.08.92)

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR92/00265

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

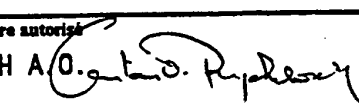
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	CELL RECEPTOR-MEDIATED APOPTOSIS IN IMMATURE THYMOCYTES' see the whole document	
X	EP, A, 0 295 955 (KUREHA KAGAKU KOGYO K.K.) 21 December 1988, see page 4, line 16 - line 34; claims	1,5,9-13
P,X	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE Vol. 175, No.2, 1 February 1992, NEW YORK, NY, US pages 331-340; H. GROUX ET AL.: 'ACTIVATION-INDUCED DEATH BY APOPTOSIS IN CD4+ T CELLS FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED ASYMPTOMATIC INDIVIDUALS' see the whole document	1-18
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L 'ACADEMIE DES SCIENCES, SERIE III, Vol. 312, No.12, 6 June 1991, MONTREUIL FR pages 599-606; H. GROUX ET AL.: 'L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ DE SUJETS ASYMPTOMATIQUES INFECTES PAR LE VIH ENTRAÎNE LE DECLenchement D'UN PROGRAMME DE MORT LYMPHOCYTAIRE PAR APOPTOSE.' see the whole document	1-3,6,7,10-13
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES, SERIE III Vol. 312, No.11, 23 May 1991, MONTREUIL FR pages 529-537; M.-L. GOUGEON ET AL.: 'MISE EN EVIDENCE D'UN PROCESSUS D'ENGAGEMENT VERS LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE DANS LES LYMPHOCYTES DE PATIENTS INFECTES PAR LE VIH.' see the whole document	1,4,8,10-13
P,A	IMMUNOLOGY TODAY Vol. 12, No.4 April 1991, CAMBRIDGE, GB pages 102-105; J.C. AMEISEN ET AL.: 'CELL DYSFUNCTION AND DEPLETION IN AIDS: THE PROGRAMMED CELL DEATH HYPOTHESIS.' see the whole document	1-18

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9200265
SA 58641

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 29/07/92

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4814323	21-03-89	None	
US-A-4427684	24-01-84	None	
WO-A-9005541	31-05-90	CA-A- 2003455	23-05-90
		EP-A- 0445228	11-09-91
		JP-T- 4502009	09-04-92
EP-A-0295955	21-12-88	JP-A- 63316730	26-12-88
		US-A- 4985543	15-01-91

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷			
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB			
CIB 5	A61K37/02; A61K35/12;	A61K31/45; A61K31/645;	A61K39/395; C12Q1/02; A61K37/46 C12N5/08
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE			
Documentation minimale consultée ⁸			
Système de classification		Symboles de classification	
CIB 5	A61K ;	C07K ;	C12Q ; C12N
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté			
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰			
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹² des passages pertinents ¹³		No. des revendications visées ¹⁴
X	US,A,4 814 323 (J.M. ANDRIEU ET AL.) 21 Mars 1989 voir le document en entier ---		1-3,6,7, 10-13
X	NATURE. vol. 339, 22 Juin 1989, LONDON GB pages 625 - 626; Y. SHI ET AL.: 'CYCLOSPORIN A INHIBITS ACTIVATION-INDUCED CELL DEATH IN T-CELL HYBRIDOMAS AND THYMOCYTES.' voir le document en entier ---		1-3,6,7, 10-12
X	US,A,4 427 684 (R.O. ORES) 24 Janvier 1984 voir le document en entier ---		1-3,6,7, 10-12
	-/-		
<p>¹⁰ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>			
IV. CERTIFICATION			
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
29 JUILLET 1992		05.08.92	
Administration chargée de la recherche internationale		Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS		RYCKEBOSCH A. 	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ¹⁵	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
X	WO,A,9 005 541 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN ET AL.) 31 Mai 1990 voir page 2, ligne 18 - page 3, ligne 32; revendications ----	1,4,8, 10-13
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. vol. 265, no. 6, 25 Février 1990, BALTIMORE US pages 3009 - 3011; D.J.MCCONKEY ET AL.: 'INTERLEUKIN 1 INHIBITS T CELL RECEPTOR-MEDIATED APOPTOSIS IN IMMATURE THYMOCYTES.' voir le document en entier ----	1,4,8, 10-13
X	EP,A,0 295 955 (KUREHA KAGAKU KOGYO K.K.) 21 Décembre 1988 voir page 4, ligne 16 - ligne 34; revendications ----	1,5,9-13
P,X	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE vol. 175, no. 2, 1 Février 1992, NEW YORK, NY, US pages 331 - 340; H. GROUX ET AL.: 'ACTIVATION-INDUCED DEATH BY APOPTOSIS IN CD4+ T CELLS FROM HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-INFECTED ASYMPTOMATIC INDIVIDUALS.' voir le document en entier ----	1-18
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES, SERIE III, vol. 312, no. 12, 6 Juin 1991, MONTREUIL FR pages 599 - 606; H. GROUX ET AL.: 'L'ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD4+ DE SUJETS ASYMPTOMATIQUES INFECTES PAR LE VIH ENTRAÎNE LE DECLenchement D'UN PROGRAMME DE MORT LYMPHOCYTAIRE PAR APOPTOSE.' voir le document en entier ----	1-3,6,7, 10-13
P,X	COMPTES RENDUS DES SEANCES DE L'ACADEMIE DES SCIENCES, SERIE III, vol. 312, no. 11, 23 Mai 1991, MONTREUIL FR pages 529 - 537; M.-L. GOUGEON ET AL.: 'MISE EN EVIDENCE D'UN PROCESSUS D'ENGAGEMENT VERS LA MORT CELLULAIRE PAR APOPTOSE DANS LES LYMPHOCYTES DE PATIENTS INFECTES PAR LE VIH.' voir le document en entier ----	1,4,8, 10-13

-/-

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
P,A	IMMUNOLOGY TODAY vol. 12, no. 4, Avril 1991, CAMBRIDGE, GB pages 102 - 105; J.C. AMEISEN ET AL.: 'CELL DYSFUNCTION AND DEPLETION IN AIDS: THE PROGRAMMED CELL DEATH HYPOTHESIS.' voir le document en entier ---	1-18

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9200265
SA 58641

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets. 29/07/92

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-4814323	21-03-89	Aucun	
US-A-4427684	24-01-84	Aucun	
WO-A-9005541	31-05-90	CA-A- 2003455	23-05-90
		EP-A- 0445228	11-09-91
		JP-T- 4502009	09-04-92
EP-A-0295955	21-12-88	JP-A- 63316730	26-12-88
		US-A- 4985543	15-01-91

EPO FORM P072